

# **Modulation der akuten Entzündungsreaktion nach transienter retinaler Ischämie durch Simvastatin**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Franziska Walther  
geboren am 17. August 1984 in Gotha

Erster Gutachter: Prof. Dr.. S. Isenmann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. G. Schaible

Dritter Gutachter: Prof. Dr. T. Herdegen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. Februar 2011

*„Was wir wissen, ist ein Tropfen; was wir nicht wissen, ein Ozean.“*

Isaac Newton

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AG	Antigen
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovines</i> Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen)
<i>cDNA</i>	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	<i>enzym-linked immunosorbent assay</i> (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
ERG	Elektroretinogramm
FPP	Farnesylpyrophosphat
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i> (Gamma-Aminobuttersäure)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	<i>ganglion cell layer</i> (Ganglienzellschicht)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
<i>IOP</i>	<i>high intraocular pressure</i> (erhöhter Augeninnendruck)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A
ICAM-1	interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
<i>ILM</i>	<i>inner limiting membrane</i> (innere Gliagrenzmembran)
<i>INL</i>	<i>inner nuclear layer</i> (innere Körnerschicht)
iNOS	induzierbare Nitritoxidsynthetase
<i>IOP</i>	<i>intraocular pressure</i> (Augeninnendruck)
<i>IPL</i>	<i>inner plexiform layer</i> (innere plexiforme Schicht)
KG	Körpergewicht
LFA-1	Lymphozytenfunktion-Antigen-1



LPS	Lipopolysaccharid
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> (Verschluss der <i>Arteria cerebri media</i> )
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MMP	Matrix Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)
MW	Mittelwert
NDS	Normales <i>donkey</i> -Serum (Normales Eselserum)
NGS	Normales <i>goat</i> -Serum (Normales Ziegenserum)
NO	Nitritoxid
NOS	Nitritoxidsynthetase
OLM	<i>outer limiting membrane</i> (äußere Gliagrenzmembran)
ONL	<i>outer nuclear layer</i> (äußere Körnerschicht)
OPL	<i>outer plexiform layer</i> (äußere plexiforme Schicht)
OWG	Offenwinkelglaukom
PBS	Phosphatgepufferte Normalsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TAE	Tris Acetat EDTA
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i> (transformierender Wachstumsfaktor beta)
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
TRI	transiente retinale Ischämie
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
VCAM-1	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1
WBG	Winkelblockglaukom
ZAAV	Zentralarterienastverschluss
ZAV	Zentralarterienverschluss
ZNS	Zentrales Nervensystem

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>3. Ziele der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>4. Methodik</b>	<b>17</b>
4.1 Versuchstiere	17
4.2 Experimentelles Design	17
4.3 Unilaterale Induktion der transienten retinalen Ischämie	18
4.4 Behandlung mit Simvastatin	19
4.5 Vehikeldgabe	20
4.6 Gewebegewinnung	20
4.7 Immunhistochemie	20
4.8 RNA-Extraktion aus der Retina	24
4.9 cDNA-Synthese	25
4.10 Polymerase-Kettenreaktion	26
4.11 Enzyme-linked immunosorbent assay	28
4.12 Statistische Auswertung	29
4.13 Verwendete Lösungen	30
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>32</b>
5.1 Mikrogliaaktivierung nach transienter retinaler Ischämie	32
5.2 Produktion proinflammatorischer Zytokine nach transienter retinaler Ischämie	38
5.3 Modulation der akuten Entzündungsreaktion durch Simvastatin	42
<b>6. Diskussion</b>	<b>51</b>
6.1 Diskussion der Methoden	51
6.2 Diskussion der Ergebnisse	55
<b>7. Schlussfolgerungen</b>	<b>73</b>
<b>8. Literatur- und Quellenverzeichnis</b>	<b>74</b>
<b>9. Anhang</b>	<b>81</b>
9.1 Lebenslauf	81
9.2 Danksagung	82
9.3 Ehrenwörtliche Erklärung	83

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Durchblutungsstörungen der Netzhaut (retinale Ischämie) spielen eine zentrale Rolle bei verschiedenen ophthalmologischen Erkrankungen, wie dem Zentralarterienverschluss (ZAV), der diabetischen Retinopathie sowie dem Glaukom und sind für einen Großteil der Erblindungen in den Industrienationen mit verantwortlich. Retinale Ischämie setzt zahlreiche, bislang nicht vollständig aufgeklärte, pathophysiologische Vorgänge in Gang und führt zum Untergang von Ganglienzellen und weiteren Neuronen der Retina. Vorangegangene Untersuchungen legen eine wesentliche Beteiligung der postischämischen Entzündungsreaktion am neuronalen Zelltod nahe. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte das Verhalten von Mikrogliazellen, sowie die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  als Teil der postischämischen inflammatorischen Antwort untersucht werden.

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden mit adulten Wistarratten durchgeführt. Das Einleiten isotoner Kochsalzlösung in die vordere Augenkammer und die resultierende Erhöhung des intraokulären Druckes erzeugte eine transiente, globale Retinaischämie (TRI). Oben genannte Parameter wurden zu den Zeitpunkten 3, 6, 12 und 24 Stunden postischämisch mittels Immunhistochemie, semiquantitativer *PCR* und *ELISA* untersucht und mit der nicht-ischämischen Netzhaut von Kontrolltieren verglichen.

Die immunhistochemische Charakterisierung von Mikrogliazellen durch OX42, einen etablierten Marker für Mikrogliazellen/Makrophagen, bestätigte das Vorkommen einzelner Mikrogliazellen unter physiologischen Bedingungen in der Netzhaut. TRI führte zu einer Mikrogliazellaktivierung innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beendigung der Ischämie, erkennbar an einer Zunahme der Zellzahl und charakteristischen morphologischen Veränderungen. Im selben Zeitraum ließ sich eine gesteigerte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  nachweisen. Beide zeigten eine ähnliche Expressionskinetik mit einem frühen postischämischen Maximum und einem Wiederabsinken innerhalb von 24 Stunden. Als IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen konnten nachfolgend OX42-positive Mikrogliazellen identifiziert werden.

HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren, kurz Statine genannt, zählen zu den am häufigsten verordneten Pharmaka weltweit. Sie hemmen die

Cholesterinbiosynthese und schützen vor Myokardinfarkt und Schlaganfall. Vorangegangene Untersuchungen postulierten zahlreiche, teilweise cholesterinunabhängige Effekte, neuroprotektive und immunmodulatorische Eigenschaften sowie ein therapeutisches Potenzial dieser Substanzen bei ophthalmologischen Erkrankungen.

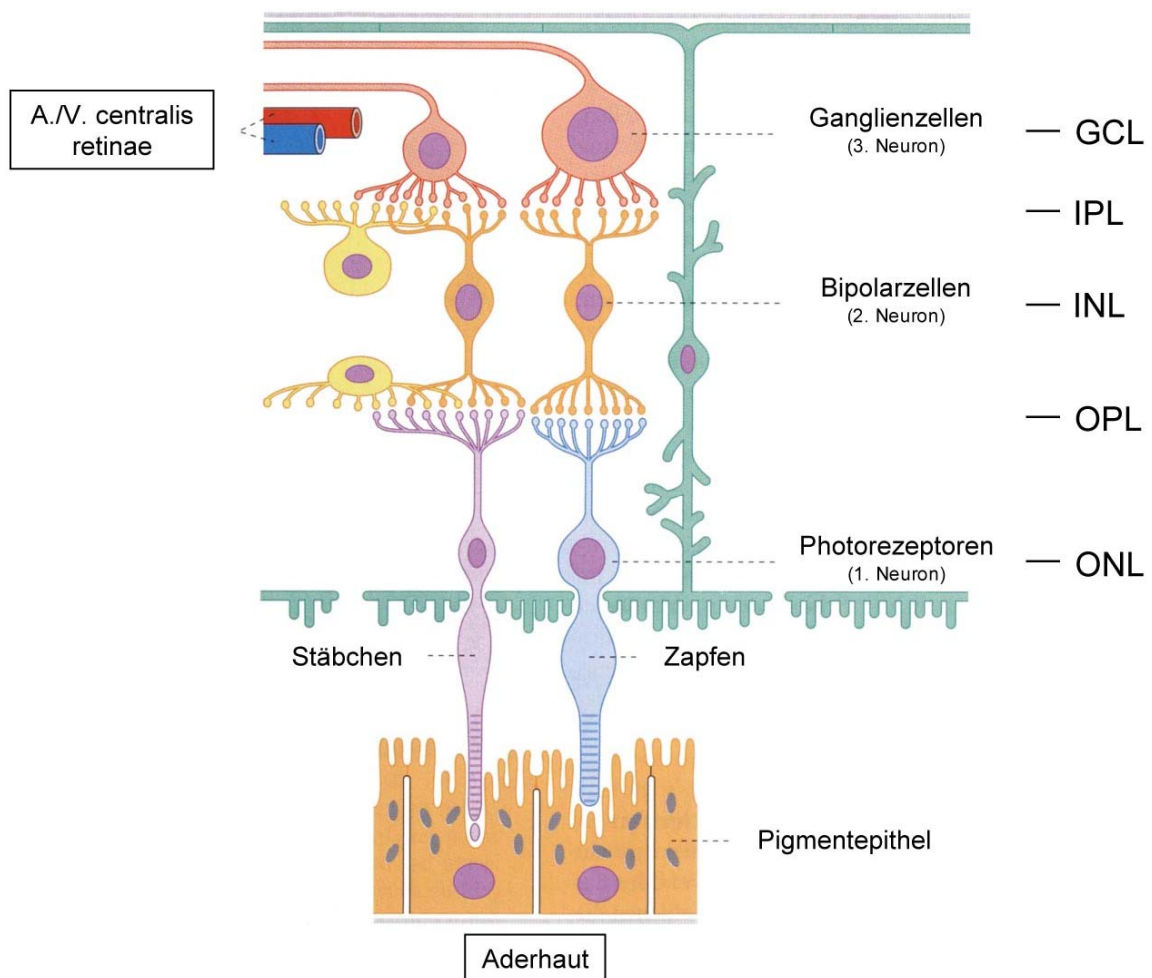
Im zweiten Teil der Studie sollte die Beeinflussbarkeit der zuvor charakterisierten inflammatorischen Antwort durch Simvastatin untersucht werden. Dazu wurde einer Gruppe von Tieren einmalig eine Stunde postischämisch Simvastatin subkutan, sowie einer Vergleichsgruppe ein Vehikel injiziert. Hierbei zeigte sich eine Simvastatin-vermittelte Reduktion der postischämischen Expression von TNF $\alpha$  zu den Zeitpunkten 6 und 12 Stunden. Eine Simvastatin-spezifische Beeinflussung der IL-1 $\beta$ -Expression war nicht nachweisbar. Die Anzahl OX42-positiver Mikrogliazellen nach TRI blieb nach Statingabe ebenfalls unverändert.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass druckinduzierte TRI zu einer akuten inflammatorischen Antwort in der Retina führt, welche durch Mikrogliazellaktivierung und die gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist. Ihre zentrale Rolle in der Pathogenese der ischämischen Retinaschädigung und die experimentelle Beeinflussbarkeit machen diese zu einem wichtigen Angriffspunkt potenziell neuroprotektiver Strategien. Durch postischämische Gabe von Simvastatin kann das Ausmaß der inflammatorischen Antwort nach TRI begrenzt werden. Als möglicher Wirkmechanismus ist hierbei die Beeinflussung der TNF $\alpha$ -Expression anzusehen. Mikrogliazellaktivierung und die Expression von IL-1 $\beta$  können in diesem Zusammenhang nicht als Angriffspunkt angesehen werden. Zusätzliche Untersuchungen werden notwendig sein, um die Bedeutung der inflammatorischen Antwort für das Ausmaß der retinalen Schädigung nach TRI aufzuklären und weitere Statin-vermittelte Effekte in diesem Modell zu prüfen.

## 2. EINLEITUNG

Der Begriff *Ischämie* stammt aus dem Griechischen und leitet sich von den Wörtern „*iskho*“ („halte zurück“) und „*haima*“, der griechischen Bezeichnung für „Blut“, ab. Charakteristisch für einen solchen Zustand ist dementsprechend eine Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung eines Gewebes, Organteils oder Organs (Pschyrembel 2004). Betreffen diese Veränderungen die Netzhaut, so spricht man von retinaler Ischämie, welche eine zentrale Rolle bei verschiedenen ophthalmologischen Erkrankungen spielt. Beispielhaft seien hier retinale Gefäßverschlüsse, die diabetische Retinopathie und das Glaukom genannt, die für einen Großteil der Erblindungen in den Industrienationen verantwortlich gemacht werden.

Bei vaskularisierten Geweben werden die Auswirkungen ischämischer Schädigung von verschiedenen Faktoren bestimmt. Eine zentrale Rolle kommt hierbei der komplexen Anatomie der retinalen Blutversorgung sowie dem Ausmaß und der Dauer der Blutleere zu. Ursächlich für die duale Gefäßversorgung der Netzhaut ist deren Entwicklungsgeschichte. Embryologisch geht sie aus dem doppelwandigen Augenbecher hervor, welcher eine Ausstülpung des Zwischenhirns darstellt. Das äußere Blatt des Augenbechers entwickelt sich zum Pigmentepithel (*Pars pigmentosa retinae*), während das innere Blatt die *Pars nervosa retinae* bildet. Letztere entwickelt sich zu den übrigen 9 Schichten der Netzhaut, welche in charakteristischer Anordnung die drei Neurone der Sehbahn (Photorezeptoren, Bipolarzellen, Ganglienzellen) beinhalten (Abb. 1). Während die äußeren Schichten (6 bis 10) durch Diffusion von der Aderhaut (*Lamina choriocapillaris*) versorgt werden, wird die Ernährung der inneren Netzhautanteile bis zur inneren Körnerschicht durch die *Arteria centralis retinae* gewährleistet (Abb. 1). Dieser Ast der *A. ophthalmica* tritt an der Sehnervpapille in das Auge ein und verzweigt sich an der inneren Netzhautoberfläche. Gemeinsam mit der *A. centralis retinae* verläuft die Zentralvene, welche das venöse Blut der inneren Retinaschichten drainiert. Die Kenntnis dieser anatomischen Gegebenheiten ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Folgen retinaler Gefäßverschlüsse, welche eine der Hauptursachen retinaler Ischämie darstellen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus der Retina und ihrer dualen Blutversorgung, modifiziert nach Welsch (Welsch 2003). (GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerschicht)

Abzugrenzen sind hierbei retinale Arterienverschlüsse von Venenverschlüssen. Die Einteilung ersterer erfolgt in Zentralarterienverschlüsse und Verschlüsse eines Zentralarterienastes (ZAAV). Häufigste Ursache retinaler Arterienverschlüsse sind Embolien, vor allem im Rahmen einer Arteriosklerose der *A. carotis interna*. Aber auch Vaskulitiden, Gefäßspasmen und Aneurysmen können eine Rolle bei der Entstehung der Arterienverschlüsse spielen (Feltgen et al. 2003). Während es bei einem Verschluss eines Zentralarterienastes zu einer umschriebenen Ischämie des entsprechenden Netzhautareals kommt, führt ein Zentralarterienverschluss zu einer kompletten Ischämie der inneren Retina bei unbeeinträchtigter Perfusion der äußeren Netzhautschichten. Trotz optimaler Therapie ist die Prognose bezüglich

des Sehvermögens schlecht, da insbesondere bei einer Ischämiedauer von über 100 Minuten irreversible strukturelle Schäden angenommen werden müssen (Hayreh und Weingeist 1980).

Abzugrenzen von den Veränderungen retinaler Hauptgefäße sind Erkrankungen kleiner Netzhautgefäße. Die diabetische Retinopathie ist die häufigste retinale Mikroangiopathie und die bedeutendste Ursache visueller Beeinträchtigung bei Menschen im erwerbsfähigen Alter der westlichen Welt (Kocur und Resnikoff 2002). Wie durch Zheng und Mitarbeiter gezeigt wurde, kommt es auch im Rahmen retinaler Ischämie, wie sie bei der transienten druckinduzierten Minderperfusion auftritt, zu einem Untergang retinaler Kapillaren, ähnlich wie bei der diabetischen Retinopathie (Zheng et al. 2007).

Als letzte für die vorliegende Arbeit bedeutsame ophthalmologische Erkrankung sei an dieser Stelle das Glaukom genannt. Dieser Begriff bezeichnet verschiedene, meist mit einem erhöhten Augeninnendruck assoziierte Krankheitsbilder, denen eine progressive Schädigung der Ganglienzellen der Netzhaut und des optischen Nervs gemeinsam ist. Der Untergang retinaler Ganglienzellen und ihrer Axone manifestiert sich zunächst im Bereich der Sehnervenpapille, wobei das Ausmaß der Zellschädigung mit der Höhe des Augeninnendrucks korreliert (Quigley 1999). Je nach Beschaffenheit des Kammerwinkels unterscheidet man klinisch das Offenwinkelglaukom vom Winkelblockglaukom. Bei ersterem handelt es sich um eine chronische Erkrankung mit meist mäßig erhöhtem Augeninnendruck, die durch den langsam voranschreitenden Untergang von Ganglienzellen und Sehnervenfasern und den daraus resultierenden allmählichen Funktionsverlust des Auges charakterisiert ist (Quigley 1999). Im Gegensatz dazu manifestiert sich das Winkelblockglaukom meist als akute Form mit anfallartiger Erhöhung des Augeninnendrucks auf 50 bis 80 mmHg (Pschyrembel 2004). Häufigste Ursache eines primären Winkelblockglaukoms ist die Behinderung der Kammerwasserzirkulation durch den so genannten Pupillarblock, wobei es durch Anlagerung der Irisbasis an das Trabekelwerk zu einer Abflussbehinderung kommt (Gobel und Grehn 1998).

Die klinische Bedeutung retinaler Ischämie und deren einfache methodische Umsetzbarkeit haben zur Entwicklung unterschiedlicher Tiermodelle geführt, die es erlauben Pathomechanismen im Rahmen retinaler Minderperfusion zu untersuchen und mögliche Behandlungsmöglichkeiten zu evaluieren.

In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir das von Büchi und Mitarbeitern entwickelte Modell der transienten druckinduzierten Minderperfusion, wobei es durch Einleiten isotoner Kochsalzlösung aus einem in 2 Meter Höhe befindlichem Reservoir in die vordere Augenkammer zu einem deutlichen Anstieg des intraokulären Druckes kommt (Tab. 1, Buchi et al. 1991). Diese auch als *HIOP* (*high intraocular pressure*) bezeichnete Methode führt sowohl zu einer Unterbrechung der retinalen als auch der choroidalen Blutzufuhr. Die komplette Ischämie der inneren Retinaschichten spiegelt den Pathomechanismus des retinalen Zentralarterienverschluss wider, wenngleich es durch den plötzlichen, starken Augeninnendruckanstieg ebenfalls als Modell eines akuten Winkelblockglaukoms (WBG) verstanden werden kann (Osborne et al. 2004).

Ein weiteres Modell der kompletten Retinaischämie stellt die Ligatur des *Nervus opticus* bei gleichzeitigem Verschluss der dem Sehnerven angelagerten Gefäße (*A. centralis retinae* und *Aa. ciliares posteriores*) dar (Tab. 1). Für tierexperimentelle Arbeiten zum ZAAV findet die Photothrombose als Modell Anwendung (Tab. 1). Fehlende Möglichkeiten der nichtinvasiven Beurteilung zellulärer Reaktionen retinaler Ganglienzellen und des optischen Nervs infolge intraokulärer Drucksteigerung beim Menschen führten zur Entwicklung verschiedener Tiermodelle zur Untersuchung glaukomatöser Schädigungsmechanismen. Die drei am häufigsten verwendeten Modelle basieren auf einer chronischen Erhöhung des Augeninnendruckes, einem Risikofaktor für die Entwicklung eines Glaukoms (Tab. 1, Morrison et al. 2005). Ihnen ist eine chronische Druckerhöhung auf das 1,3 bis 2fache der Norm gemeinsam (Morrison et al. 2005). Der Schädigungsmechanismus ist somit dem des Offenwinkelglaukoms vergleichbar. Als Modell für das akute Winkelblockglaukom kann, wie oben beschrieben, das der transienten druckinduzierten Ischämie dienen.



**Tabelle 1:** Tiermodelle zur Erzeugung retinaler Ischämie und eines erhöhten Augeninnendruckes. <sup>1</sup>retinale Ischämie, <sup>2</sup>Zentralarterienverschluss, <sup>3</sup>Winkelblockglaukom, <sup>4</sup>Zentralarterienastverschluss, <sup>5</sup>Offenwinkelglaukom

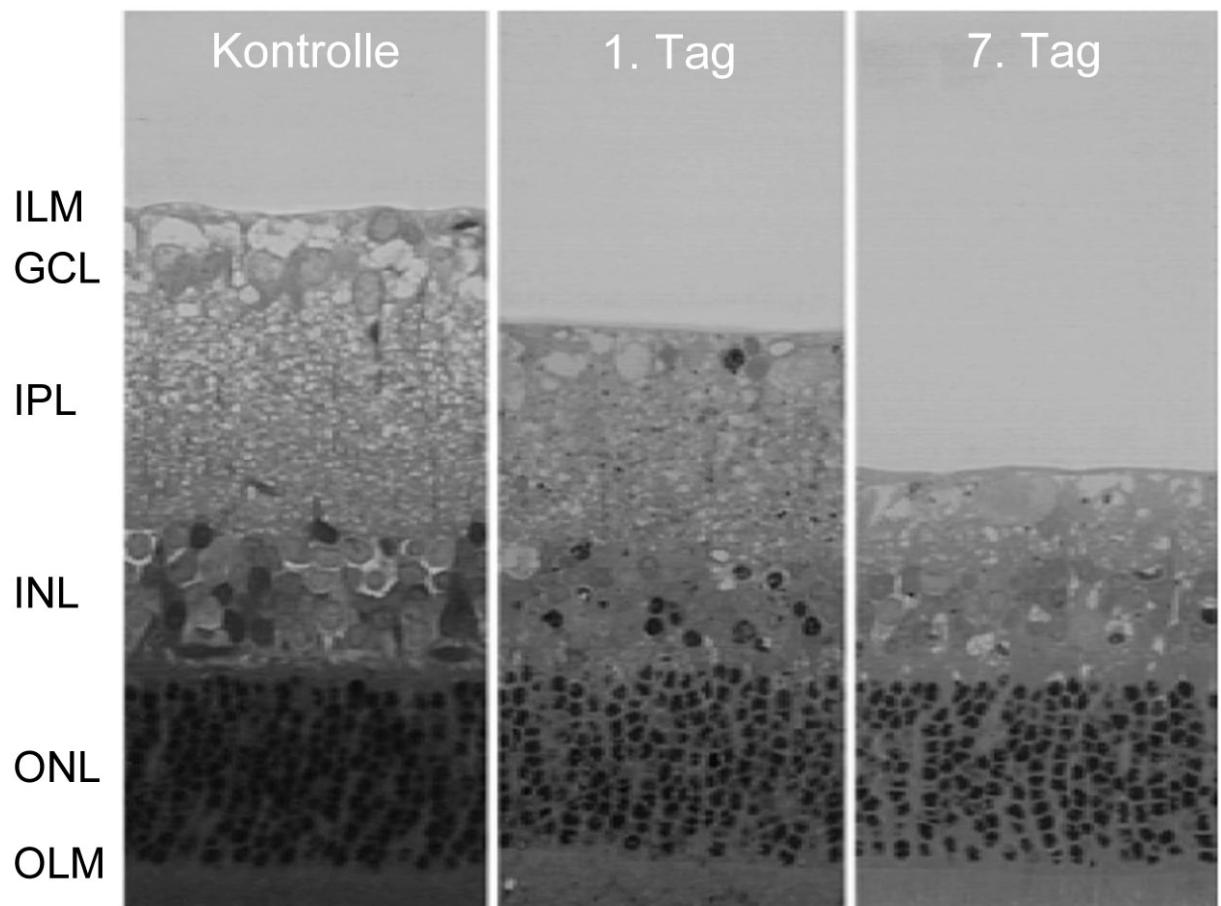
Modell	Pathomechanismus	Klinik	Referenz
<i>HIOP</i>	komplette RI <sup>1</sup> akute <i>IOP</i> -Erhöhung	ZAV <sup>2</sup> WBG <sup>3</sup>	(Buchi et al. 1991)
Ligatur des Sehnervs	komplette RI <sup>1</sup>	ZAV <sup>2</sup>	(Stefansson et al. 1988)
Photothrombose	inkomplette RI <sup>1</sup>	ZAAV <sup>4</sup>	(Mosinger und Olney 1989)
Photokoagulation des Trabekelwerkes	chronische <i>IOP</i> -Erhöhung	OWG <sup>5</sup>	(Levkovitch-Verbin et al. 2002)
episklerale Venenokklusion	chronische <i>IOP</i> -Erhöhung	OWG <sup>5</sup>	(Shareef et al. 1995)
Injektion hypertoner NaCl-Lösung	chronische <i>IOP</i> -Erhöhung	OWG <sup>5</sup>	(Morrison et al. 1997)

Eine große Anzahl tierexperimenteller Studien in den letzten 20 Jahren hat zur Aufklärung zahlreicher pathophysiologischer Vorgänge im Rahmen retinaler Ischämie beigetragen, wobei die gewonnen Erkenntnisse aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Modelle als nur bedingt vergleichbar gelten und zahlreiche Mechanismen auf molekularer Ebene bis heute unzureichend erforscht sind. Der folgende Überblick bekannter ischämieinduzierter Retinaveränderungen beschreibt deshalb im Wesentlichen Vorgänge im Rahmen druckinduzierter TRI als dem von uns verwendeten Modell und stützt sich auf drei Säulen der Betrachtung. Diese beinhalten elektrophysiologische Studien zur Charakterisierung des funktionellen Status der Retina, histologisch-morphologische Untersuchungen sowie molekularbiologische Analysen zur Aufklärung zugrundeliegender Signalkaskaden.

Bei der funktionellen Charakterisierung retinaler Reaktionen im Rahmen akuter Ischämie kommt der Elektroretinographie (ERG) eine herausragende Bedeutung zu. Diese bezeichnet die Ableitung von elektrischen Potentialen zwischen der *Cornea* und einer indifferenten Schläfenelektrode nach Lichtstimulation und ist Ausdruck einer retinalen Massenantwort. Leitet man das Elektroretinogramm vor, während und nach druckinduzierter Retinaischämie ab, werden ERG-

Veränderungen mit Einsetzen der Druckerhöhung sichtbar. Schon eine kurze Ischämiedauer führt zur Abnahme der Wellenamplitude bis hin zur vollständigen Suppression (Osborne et al. 1995, Rosenbaum et al. 2001). Nach Beendigung der Ischämie lässt sich eine Normalisierung der Amplitude beobachten, wobei das Ausmaß der Erholung abhängig von der vorangegangenen Ischämiedauer ist. So kommt es nach bis zu 50-minütigen Ischämien zur vollständigen, nach 90 und 120 Minuten dauernden Minderperfusionen nur zu einer inkompletten Erholung (Block und Schwarz 1998).

Histologisch-morphologische Studien nach *HIOP* dienen in erster Linie der Beurteilung von Ausmaß und Lokalisation der Zellschädigung. So fanden Büchi und Mitarbeiter heraus, dass es im Verlauf der folgenden Tage nach TRI zu einer progressiven Verminderung der Ganglienzellzahl und einer Abnahme der Retinadicke kommt (Buchi et al. 1991). In zahlreichen darauffolgenden Untersuchungen konnte dies bestätigt werden, wobei sich unterschiedliche Empfindlichkeiten einzelner Retinaschichten gegenüber ischämischer Schädigung zeigten. Trotz der vorliegenden Unterbrechung der gesamten (retinalen und choroidalen) Netzhautdurchblutung scheinen die äußeren Retinaschichten und die darin lokalisierten Photorezeptoren ischämieresistenter als die inneren Schichten, inklusive der Ganglienzellschicht zu sein (Osborne et al. 2004). Rosenbaum und Mitarbeiter konnten zeigen, dass es 7 Tage nach einer druckinduzierten 60-minütigen TRI zu einer Abnahme der absoluten Retinadicke kommt, wobei insbesondere innere Schichten von dieser Ausdünnung betroffen sind (Abb. 2). Des Weiteren ließ sich eine Abnahme der Zellzahl sowohl der *INL* als auch der *GCL* beobachten (Rosenbaum et al. 2001). Neuronale Zellschädigung nach *HIOP* umfasst neben dem Untergang von retinalen Ganglienzellen, der Degeneration der *IPL* und Nervenfaserschicht auch die Schädigung der Axone des optischen Nervis. Das Ausmaß der neuronalen Schädigung nach TRI hängt in entscheidendem Maße von der Dauer der Minderperfusion ab, wobei bereits eine 45-minütige Blutleere zu histologisch sichtbaren Veränderungen führt, deren Komplexität bei längerer Dauer kontinuierlich zunimmt (Adachi et al. 1996).



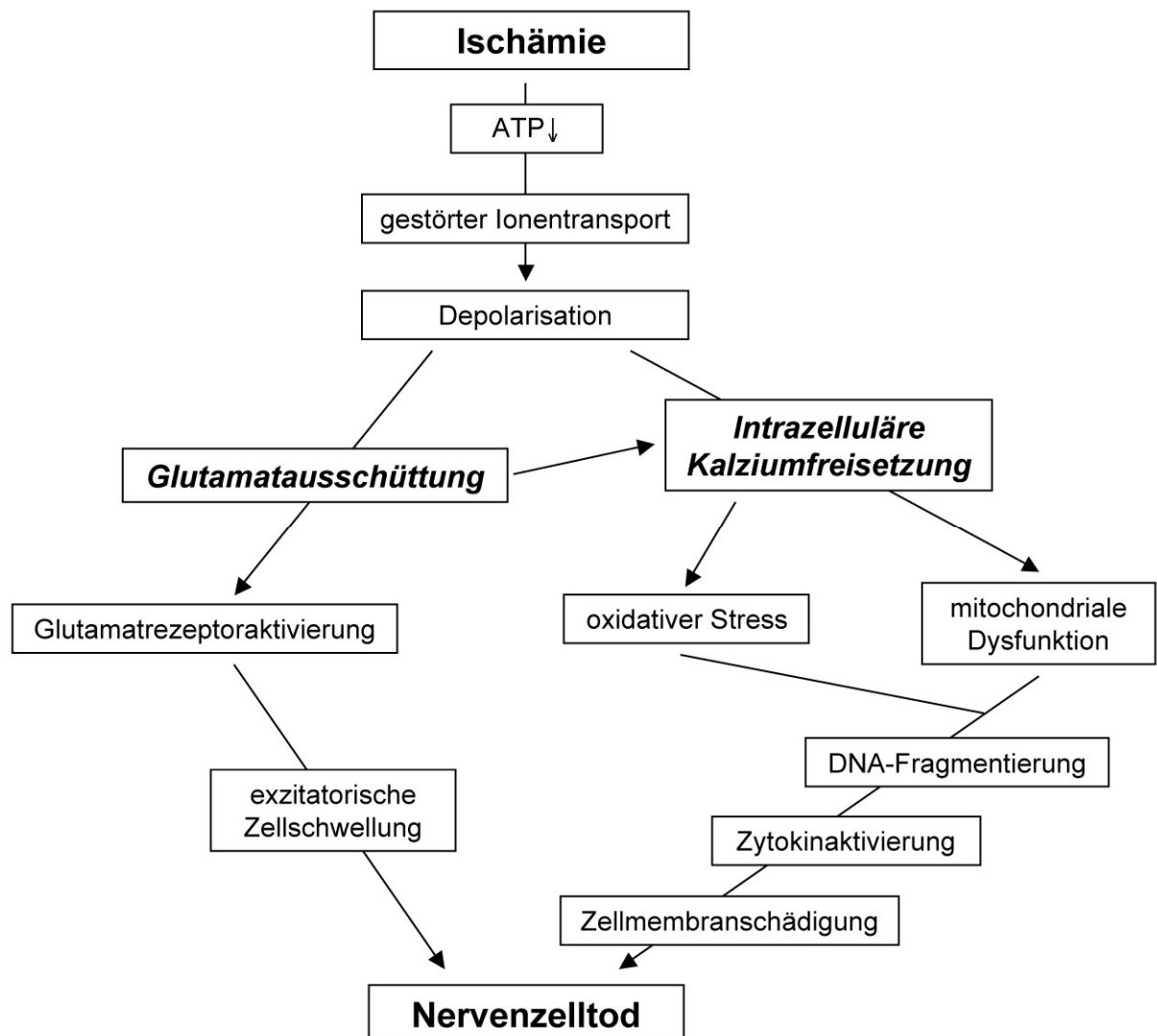
**Abbildung 2:** Abnahme der absoluten Retinadicke mit besonderer Empfindlichkeit der inneren Retinaschichten nach 60-minütiger HIOP, modifiziert nach (Rosenbaum et al. 2001). (ILM = innere Gliagrenzmembran, GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, ONL = äußere Körnerschicht, OLM = äußere Gliagrenzmembran)

Versteht man den neuronalen Zelltod als pathophysiologischen Mittelpunkt der ischämischen Retinaschädigung, kommt dem Verständnis seiner molekularen Grundlagen insbesondere hinsichtlich der Entwicklung potentiell neuroprotektiver Strategien eine enorme Bedeutung zu. Vorangegangene Untersuchungen legen nahe, dass retinale Ganglienzellen infolge traumatischer Schädigung hauptsächlich durch Apoptose zugrunde gehen (Isenmann et al. 2003). Beispielsweise führt HIOP zum verzögerten Zelluntergang der inneren Retinaschichten, wobei der überwiegende Teil der sterbenden Zellen typische histologische Merkmale der Apoptose (Chromatinkondensation, Zellschrumpfung und Bildung von Apoptosekörperchen) zeigt (Rosenbaum et al. 1997). Unter Verwendung der TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*),

welche die Identifizierung von Zellkernen apoptotischer Zellen erlaubt, zeigt sich des Weiteren eine Zunahme der Anzahl *TUNEL*-positiver Zellen in der inneren Retina mit einem frühen Maximum 24 bis 48 Stunden nach TRI (Rosenbaum et al. 1998).

In den letzten Jahren gelang es mannigfaltige Mechanismen aufzudecken, die dem ischämiebedingten neuronalen Zelltod zu Grunde liegen (Abb. 3), wobei viele Erkenntnisse über pathophysiologische Zusammenhänge aus Untersuchungen am Gehirn stammen und trotz des gemeinsamen embryologischen Ursprungs der Gewebe als nur bedingt übertragbar gelten. Durch die unterbrochene Blutzufuhr kommt es zunächst zu einem reduzierten Angebot von Sauerstoff und Glukose. Der zelluläre ATP-Mangel führt zum Versagen energieabhängiger Ionentransportprozesse, zu Verschiebungen des Membranpotentials, neuronaler Depolarisation und Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren, insbesondere von Glutamat (Osborne et al. 1999). Ausgehend von einer erhöhten Empfindlichkeit Glutamatrezeptoren-exprimierender Neurone gegenüber Ischämie und der gegebenen hohen Dichte ionotroper Glutamatrezeptoren auf retinalen Ganglienzellen (Brandstatter et al. 1994) muss eine besondere Empfindlichkeit dieser Zellen gegenüber hohen extrazellulären Glutamatspiegeln angenommen werden (Isenmann et al. 2003). Extrazelluläre Glutamatakkumulation führt einerseits zu einer akuten exzitatorischen Zellschwellung, ausgelöst durch einen zellulären Natrium-, Chlorid- und Wassereinstrom und bedingt andererseits eine zeitlich verzögerte, calciumabhängige Zellschädigung, die die bestehende intrazelluläre Calciumüberladung noch verstärkt (Lipton 1999). Der exzessive Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration gilt als ein zentraler Mechanismus des neuronalen Zelltodes und ist mitverantwortlich für zahlreiche nachteilige Effekte wie mitochondriale Dysfunktion und oxidativen Stress (Osborne et al. 1999). Freie Radikale wie sie während der Ischämie und insbesondere in der frühen Reperfusionsphase in großen Mengen entstehen, können unter anderem durch *DNA*-Fragmentierung, Aktivierung von Zytokinen und Zellmembranschädigung infolge Peroxidation ungesättigter Fettsäuren wesentlich zum ischämieinduzierten neuronalen Zelltod beitragen (Bonne et al. 1998, Shibuki et al. 2000, Osborne et al. 2004). Von besonderer Bedeutung scheinen hierbei reaktive Sauerstoffspezies, wie zum Beispiel Superoxidanionen, zu sein. Der ischämiebedingte plötzliche Anstieg dieser Substanzen und das Versagen

antioxidativer Mechanismen könnten einen Schädigungsmechanismus retinaler Ischämie und Reperfusion darstellen (Szabo et al. 1991, Bonne et al. 1998). Diese innerhalb von Minuten und Stunden, teilweise parallel ablaufenden Prozesse werden von einer zeitlich verzögerten sekundären Entzündungsreaktion gefolgt, welche durch Leukozytenakkumulation, Mikrogliaaktivierung und Zytokinproduktion gekennzeichnet ist.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung pathophysiologischer Vorgänge nach ischämischer Schädigung, modifiziert nach Osborne und Mitarbeitern (Osborne et al. 1999). (ATP = Adenosintriphosphat)

Leukozyten scheinen eine zentrale Rolle bei Ischämie-reperfusion-induzierten Veränderungen des ZNS zu spielen (Vasthare et al. 1990). So beobachtet man nach transienter retinaler Ischämie unter anderem eine Zunahme des intermittierenden Kontakts zwischen Neutrophilen und vaskulären Endothelzellen, dem sogenannten *rolling*, als ersten Schritt der Leukozytenmigration (Tsujikawa et al. 1998). Die Freisetzung zahlreicher potentiell zytotoxischer Substanzen, wie den oben genannten reaktiven Sauerstoffspezies sowie Interleukin-1 legen eine Beteiligung der Neutrophilen an sekundärer neuronaler Schädigung nahe (Szabo et al. 1991, Hangai et al. 1995).

Mikrogliazellen kommen in allen Bereichen des zentralen Nervensystems, inklusive dem optischen Nerv und der Netzhaut vor und stellen die primären immunkompetenten Zellen dieser Gewebe dar (Streit 2002, Farber und Kettenmann 2005). Ihre Herkunft konnte bislang nicht vollständig geklärt werden, auch wenn morphologische und immunologische Gemeinsamkeiten mit Monozyten und Makrophagen einen gemeinsamen Ursprung nahe legen (Albini et al. 2005). Über die Funktion ruhender Mikrogliazellen ist nur wenig bekannt, wenngleich ihnen im gesunden Gewebe eine Homöostase- und Kontrollfunktion zugeschrieben werden kann (Nimmerjahn et al. 2005). Mikrogliaaktivierung beobachtet man bei einer Reihe experimentell erzeugter und klinischer Pathologien, wie Durchtrennung (*Axotomie*) des optischen Nervs, ischämieinduzierter Retinopathie und lichtinduzierter Photorezeptordegeneration (Zhang und Tso 2003, Davies et al. 2006, Zhang et al. 2005b). Sie umfasst charakteristische, wenngleich komplexe Vorgänge, wie die Umwandlung von der dendritischen in die amöboide Form, *de novo*-Expression von Oberflächenmolekülen, Proliferation, Migration, Phagozytose und Freisetzung zahlreicher Mediatoren (Langmann 2007). Zu diesen gehören Chemokine, proinflammatorische Zytokine, Nitritoxid, aber auch Neurotrophine und Wachstumsfaktoren (Langmann 2007). In zahlreichen Untersuchungen konnte eine Beteiligung sowohl an neuroprotektiven als auch an neurodegenerativen Vorgängen nachgewiesen werden (Aldskogius 2001, Gonzalez-Scarano und Baltuch 1999).

Zytokine sind in pikomolaren Konzentrationen wirksame zellregulatorische Eiweiße. Bislang konnten verschiedene an ihrer Bildung beteiligte Zellen des ZNS, inklusive Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen/Makrophagen, identifiziert

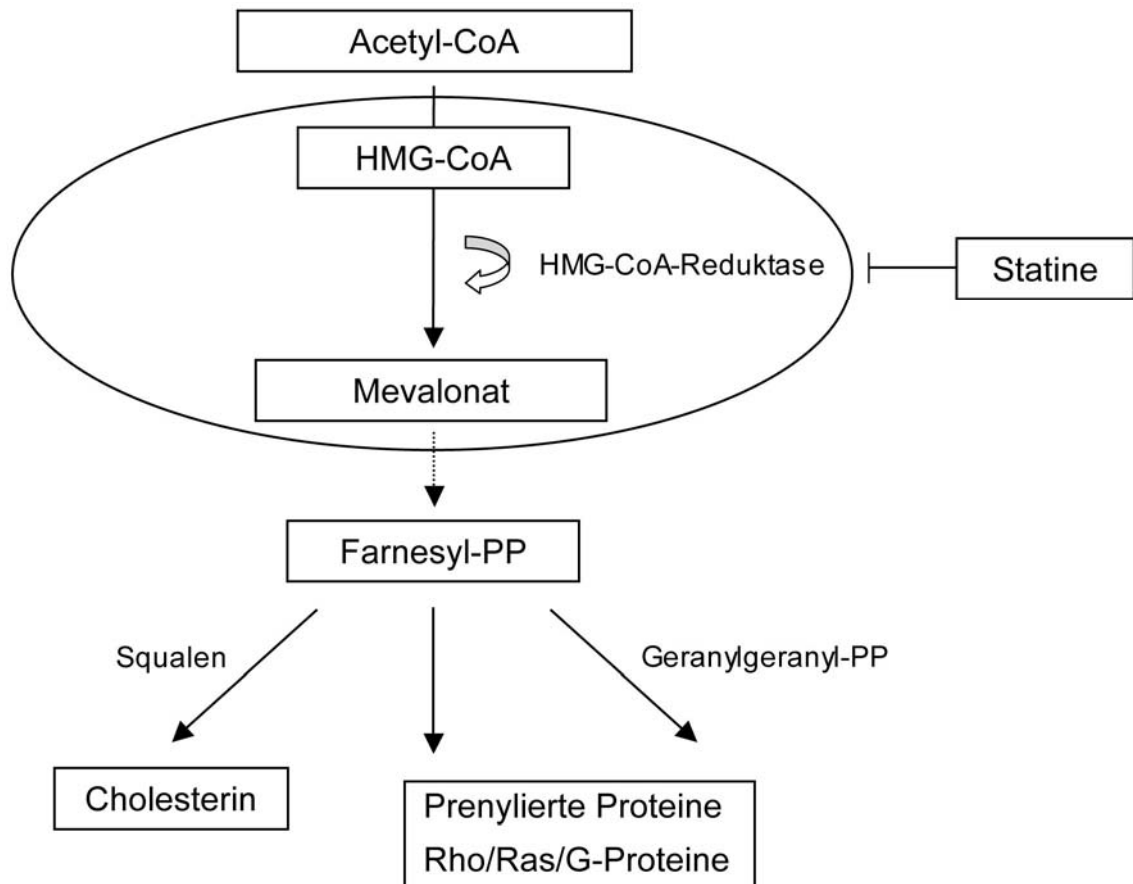
werden (Touzani et al. 1999). Zytokinen werden zahlreiche pleiotrope Effekte zugeschrieben. Diese reichen von der Regulation von Zellfunktionen während der Entwicklung bis zur Beteiligung an der Immunantwort infolge ischämischer, traumatischer oder entzündlicher Schädigung des ZNS (Wang und Shuaib 2002). Zu dieser heterogenen Gruppe von Molekülen gehören Interleukine (IL), Interferone, Chemokine und der Tumornekrosefaktor, wobei im Folgenden ein besonderes Augenmerk auf die beiden klassischen proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  gelegt werden soll. Physiologischerweise sind geringe Mengen an IL-1 $\beta$  sowohl im Gehirn als auch in der Netzhaut der Ratte nachweisbar und fokale wie globale Minderperfusion des Gehirns, sowie transiente Retinaischämie gehen mit einem Anstieg der IL-1 $\beta$ -Spiegel einher (Wang und Shuaib 2002, Yoneda et al. 2001, Yan et al. 1992). Die Beobachtung, dass das Ausmaß der resultierenden Schädigung sowohl durch kompetitive IL-1-Rezeptorantagonisten als auch durch IL-1 $\beta$ -neutralisierende Antikörper reduziert werden kann, legt eine bedeutende Rolle dieses Zytokins bei den pathophysiologischen Vorgängen retinaler Ischämie nahe (Yoneda et al. 2001). TNF $\alpha$ , der zahlreiche funktionelle Gemeinsamkeiten mit IL-1 $\beta$  aufweist, gilt als beteiligter Mediator des neuronalen Zelltods nach zerebraler und retinaler Ischämie (Barone et al. 1997, Tezel und Wax 2000). Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung der TNF $\alpha$ -Expression im Modell der *HIOP*-induzierten Ischämie, da sowohl die druckbedingte als auch ischämieinduzierte Schädigung retinaler Ganglienzellen TNF $\alpha$ -assoziiert zu sein scheint. So konnten Tezel und Wax zeigen, dass die beiden genannten Stimuli zu einer erhöhten glialen TNF $\alpha$ -Produktion und resultierender Apoptose retinaler Ganglienzellen *in vitro* führen (Tezel und Wax 2000). *In vivo* kommt es nach TRI durch Ligatur des Sehnervs zu einer frühen und anhaltenden Steigerung der TNF $\alpha$ -Expression (Hangai et al. 1996). Während die Applikation von rekombinanten TNF $\alpha$  nach *HIOP*-induzierter Ischämie das funktionelle *outcome* verschlechtert, beobachtet man eine signifikante funktionelle Verbesserung bei präischämischer Gabe eines TNF $\alpha$ -Antikörpers, so dass von einem modulierenden Einfluss des Tumornekrosefaktors im Rahmen retinaler Ischämie/Reperfusion ausgegangen werden muss (Berger et al. 2008). Die genauen Signalwege, die zur vermehrten Freisetzung dieser Zytokine nach Ischämie führen, sowie mögliche Auswirkungen erhöhter Konzentrationen im Rahmen zentraler und retinaler Minderperfusion sind Gegenstand aktueller

Forschung. Abhängig von der Art der Schädigung müssen sowohl günstige als auch nachteilige Effekte erhöhter IL-1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Spiegel bei neuronaler Schädigung in Betracht gezogen werden, wenngleich eine Reihe von Untersuchungen eine zytokinbedingte Zunahme der ischämischen Beeinträchtigung nahe legt (Wang und Shuaib 2002).

In den letzten Jahren fand in diesem Zusammenhang eine weitverbreitete Gruppe von Pharmaka besondere Beachtung. Die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA)-Reduktaseinhibitoren, kurz Statine genannt, zählen zu den am häufigsten verordneten Arzneimitteln weltweit. Fanden sie initial Anwendung zur Therapie der Dyslipoproteinämie, so werden sie heute bereits bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt und in der Sekundärprophylaxe des ischämischen Schlaganfalls eingesetzt. Ihre Wirkung entfalten sie durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, mit resultierender Blockade der Umwandlung von HMG-CoA in Mevalonat und verminderter Synthese seiner Metabolite (Abb. 4). So beobachtet man neben der Reduktion des Gesamtcholesterins eine Abnahme an isoprenoiden Zwischenprodukten, wie Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Diese Isoprenoide spielen eine wichtige Rolle bei der posttranslationalen Modifikation verschiedener Proteine, wie den kleinen GTP-bindenden Proteinen Ras und Rho, denen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zellproliferation und Differenzierung zugesprochen wird (Menge et al. 2005). In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Statine überdies zahlreiche, teilweise cholesterinunabhängige Wirkungen entfalten können. Diese sogenannten pleiotropen Effekte umfassen neben einer Verbesserung der endothelialen Funktion auch neuroprotektive und immunmodulatorische Eigenschaften. So wurden in den letzten Jahren mannigfaltige Mechanismen, wie die Induktion der endothelialen Nitritoxidsynthetase (NOS), die Hemmung der induzierbaren NOS (iNOS), die Verminderung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Förderung von Angiogenese, Neurogenese und Synaptogenese nach Schlaganfall aufgedeckt, die für eine Verbesserung des funktionellen *outcomes* nach zerebraler Ischämie verantwortlich gemacht werden (Cimino et al. 2007, Chen et al. 2003). Ihre antiinflammatorischen Wirkungen entfalten die HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren unter anderem durch Hemmung der Leukozyten-Endothel-Interaktion, Beeinflussung der T-Zell-Proliferation und T-



Zell-Aktivierung, sowie des T-Zell-Phänotyps (Weber et al. 2006, Greenwood et al. 2006).



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der Cholesterinbiosynthese. Statine hemmen die Umwandlung von HMG-CoA in Mevalonat und vermindern die Synthese von Cholesterin und isoprenoiden Zwischenprodukten.

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Studie war es, die akute Entzündungsreaktion nach transienter retinaler Ischämie anhand von Mikrogliaaktivierung und der Produktion proinflammatorischer Zytokine weiter zu charakterisieren. Anschließend sollten mögliche immunmodulatorische Eigenschaften von Simvastatin nach *HIOP* untersucht und ihre Bedeutung für die Neuroprotektion im Rahmen retinaler Ischämie evaluiert werden.

### 3. ZIELE DER ARBEIT

Der erste Teil der vorliegenden Studie wurde durchgeführt, um die akute Entzündungsreaktion nach transienter retinaler Ischämie anhand von Mikrogliaaktivierung und der Expression der klassischen proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zu charakterisieren. Anschließend sollten mögliche immunmodulatorische Eigenschaften von Simvastatin nach *HIOP* untersucht und ihre Bedeutung im Rahmen retinaler Ischämie evaluiert werden.

Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist innerhalb der ersten 24 Stunden nach *HIOP* eine sichtbare Mikrogliazellaktivierung zu verzeichnen?
2. Kommt es infolge transienter druckinduzierter Retinaischämie zu einer gesteigerten Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zu frühen postischämischen Zeitpunkten?
3. Kann das Ausmaß der inflammatorischen Antwort durch die Gabe von Simvastatin nach Induktion der Ischämie (d.h. therapeutisch) beeinflusst werden?

## 4. METHODIK

### 4.1 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden adulte, weibliche Wistarratten mit einem Gewicht von 220 bis 250 g verwendet (Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena). Die Haltung erfolgte unter konstanten, spezifisch keimfreien Bedingungen (*specific pathogen free*), im Standardkäfig. Die Raumtemperatur betrug 22 bis 24 °C, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 bis 80 Prozent und einem Tag-/Nacht-Rhythmus von 12/12 Stunden. Futter und Wasser waren über den gesamten Versuchszeitraum *ad libitum* verfügbar.

### 4.2 Experimentelles Design

Alle Versuche wurden unter Berücksichtigung des Tierversuchsgesetzes entsprechend gültiger Tierversuchsgenehmigung (Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Reg. -Nr.: 02-10/04) durchgeführt. Die Aufteilung der Tiere erfolgte in vier Versuchsgruppen (Abb. 5).

#### 4.2.1 Kontrolltiere

Als Kontrollen (Gruppe 1) galten nicht-läsionierte Tiere. Diese erhielten eine Narkose durch intraperitoneale Chloralhydratinjektion. Einer TRI wurden sie nicht ausgesetzt. Eine Behandlung mit Simvastatin oder Vehikel fand nicht statt. Die Enukleation der *Bulbi* erfolgte nach Beendigung der Narkose.

#### 4.2.2 Transiente retinale Ischämie

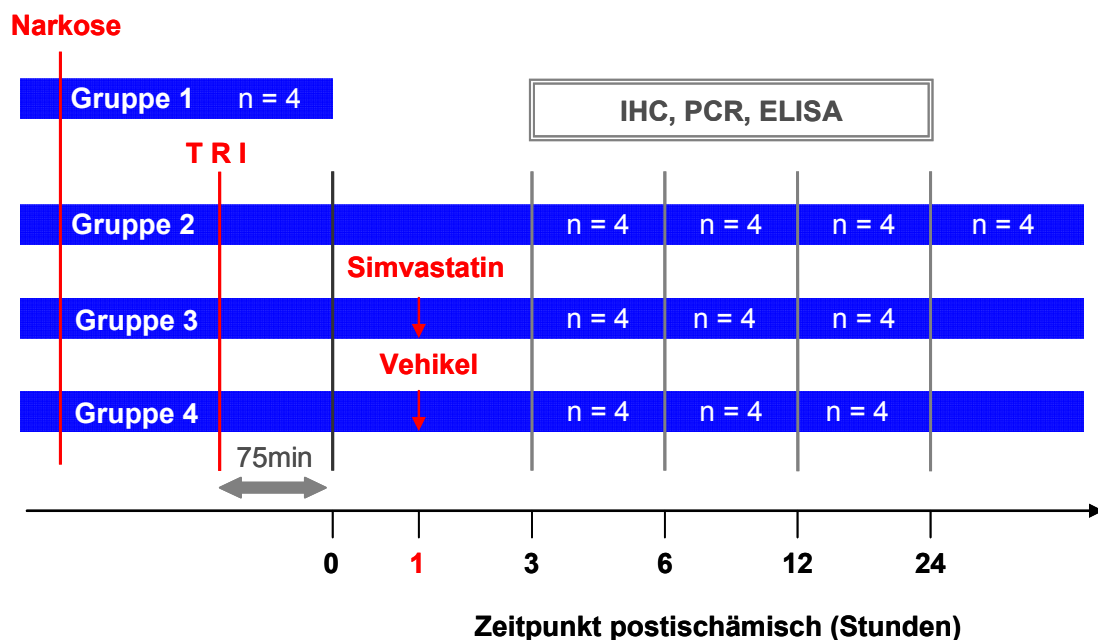
Die zweite Gruppe bestand aus Tieren, die der TRI ausgesetzt wurden, aber weder eine Injektion von Simvastatin noch von Vehikel erhielten. Die Enukleation der *Bulbi* erfolgte zu den Zeitpunkten 3, 6, 12 und 24 Stunden postischämisch.

#### 4.2.3 TRI und einmalige Gabe von Simvastatin

Die Tiere der Gruppe 3 erhielten die TRI und bekamen eine Stunde postischämisch einmalig Simvastatin 8 mg pro kg KG subkutan injiziert. Die *Bulbi* wurden 3, 6 und 12 Stunden nach Beendigung der Ischämie entnommen.

#### 4.2.4 TRI und einmalige Gabe eines Vehikels

Gruppe 4 bestand aus Tieren, die eine Stunde nach Beendigung der Ischämie eine einmalige Injektion des Vehikels subkutan erhielten. Die Entnahme der *Bulbi* erfolgte ebenfalls 3, 6 und 12 Stunden postischämisch.

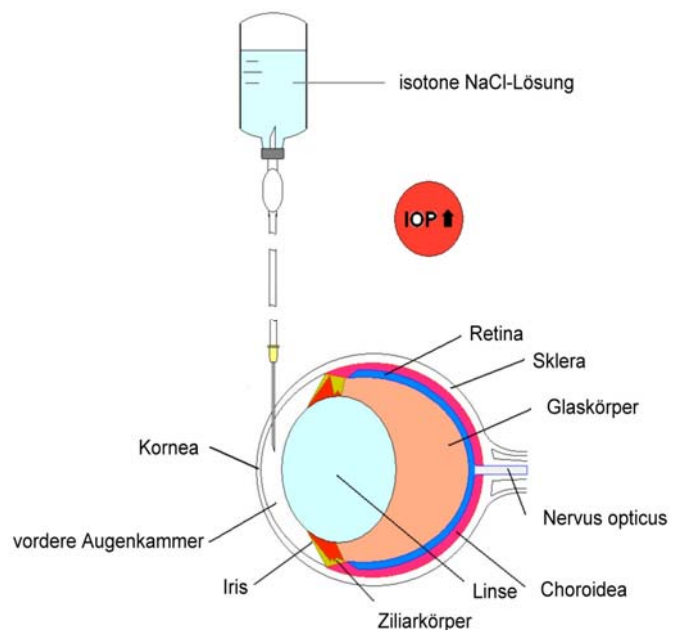


**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Studiendesigns. Abgebildet sind die Versuchsgruppen, der zeitliche Ablauf der Experimente sowie die durchgeführten Untersuchungen. (n = Anzahl der Versuchstiere, IHC = Immunhistochemie, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, ELISA = enzym-linked immunosorbent assay, TRI = transiente retinale Ischämie)

#### 4.3 Unilaterale Induktion der transienten retinalen Ischämie

Die Narkose der Tiere wurde durch gewichtsadaptierte (420 mg pro kg KG) intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat (7 %) eingeleitet. Zusätzlich erfolgten

die Lokalanästhesie des zu läsionierenden Auges mit Oxybuprocainhydrochlorid (4 mg/ml, Bausch&Lomb, Berlin), sowie eine perioperative Antibiotikaphylaxe mit Ofloxacin-Augentropfen (Bausch&Lomb, Berlin). Die transiente retinale Ischämie wurde mit Hilfe des von Büchi und Mitarbeitern entwickelten Modells in leicht modifizierter Form durchgeführt (Abb. 6, Buchi et al. 1991). Dazu wurde nach stereotaktischer Fixierung des Kopfes eine 27-Gauge-starke Nadel *transcorneal* in die vordere Augenkammer (*Camera anterior*) des rechten Auges eingebracht. Über ein gekoppeltes Infusionssystem konnte 0,9 %ige sterile Kochsalzlösung in die vordere Augenkammer eingeleitet und der intraokuläre Druck unilateral von anfänglich 10 bis 15 mmHg auf über 80 mmHg gesteigert werden. Dieser Zustand wurde 75 Minuten lang aufrecht erhalten. Sichtbare Zeichen der Druckerhöhung und einer daraus resultierenden Abnahme der retinalen Blutzirkulation waren ein Anschwellen und Abblassen des Auges. Objektiviert wurde die Höhe des Augeninnendruckes durch regelmäßige Messung mittels Rebound-Tonometer (Tiolat Ltd., Helsinki, Finnland), wie sie von Kontiola und Mitarbeitern am Rattenauge beschrieben wurde (Kontiola et al. 2001). Nach Abschluss der Behandlung konnte die Nadel entfernt und die Tiere zum Aufwachen in einen frischen Käfig verbracht werden. Der Rückgang des intraokulären Druckes auf präoperative Ausgangswerte wurde durch erneute Messung mittels Tonometer verifiziert.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Induktion der transienten retinalen Ischämie. (IOP = Augeninnendruck)

#### 4.4 Behandlung mit Simvastatin

Im zweiten Teil der Studie erhielten die Tiere der Gruppe 3 eine Stunde postischämisch eine einmalige Dosis Simvastatin (Calbiochem, Darmstadt). Zur

Vorbereitung des zu injizierenden Statins wurde dieses in Ethanol (50 mg/ml, Merck, Darmstadt) und 1 N Natronlauge (Merck, Darmstadt) gelöst und vor der Anwendung mit 1 N Salzsäure (Merck, Darmstadt) aktiviert (Ziel-pH 7,2). Jedem Tier wurden 8 mg Simvastatin pro kg KG subkutan im Bereich der rechten Leiste injiziert.

#### **4.5 Vehikelgabe**

Zur Untersuchung des alleinigen Injektionseffekts sowie einer möglichen Wirkung der zur Lösung des Simvastatins verwendeten Substanzen erhielten die Tiere der Gruppe 4 einmalig eine Stunde postischämisch eine Injektion mit Vehikel. Dieses aus Ethanol, Natronlauge und Salzsäure bestehende Gemisch wurde anstelle des Simvastatins subkutan im Bereich der rechten Leiste appliziert.

#### **4.6 Gewebegewinnung**

Nach intraperitonealer Injektion einer Überdosis an Chloralhydrat (30 %) wurde der *Bulbus* aus der *Orbita* entnommen und in gekühlte phosphatgepufferte Normalsalzlösung (PBS) gegeben. Die Präparation der Retina erfolgte unter einem Binokular (Stemi SV6, Zeiss, Jena) mit Hilfe mikrochirurgischer Pinzetten und Scheren. Die *Cornea* wurde durch einen Schnitt entlang des *Limbus corneae* abgetrennt. Anschließend konnten Linse, Ziliarkörper und Glaskörper vorsichtig entfernt werden. Waren die Augen für Gefrierschnitte und immunhistochemische Untersuchungen bestimmt, verblieb die Netzhaut im Augenbecher. Bei Gewebe, welches für *PCR* oder *ELISA* verwendet wurde, musste die Retina vorsichtig mobilisiert und von der *Choroidea* und *Sklera* separiert werden.

#### **4.7 Immunhistochemie**

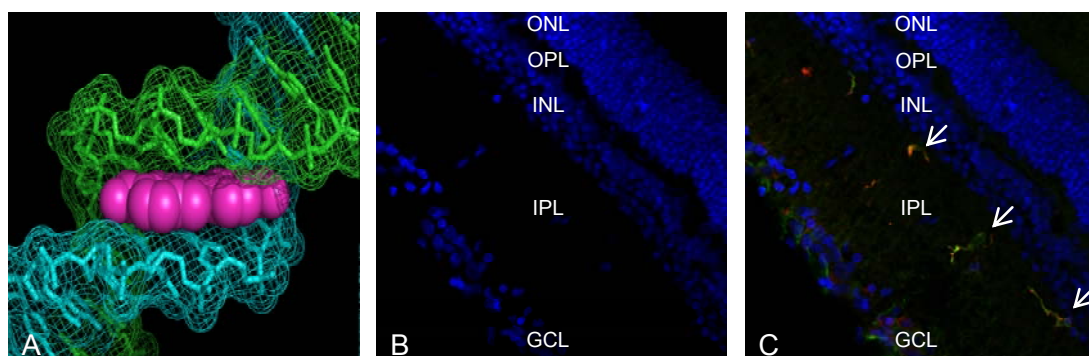
Zur Untersuchung der Mikrogliaaktivierung und Interleukinproduktion nach TRI und deren Modulation durch Simvastatin sollte eine immunhistochemische Charakterisierung OX42-positiver Zellen anhand von Zellzahl und Zellmorphologie zu verschiedenen Zeitpunkten postischämisch erfolgen. Weiterhin sollte untersucht werden, ob zytokinproduzierende Zellen nachweisbar waren und eine Zelltypcharakterisierung vorgenommen werden.

Hierzu wurden die präparierten Augenbecher inklusive Retina für 30 Minuten mit 4 %iger Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert. Nach einem Waschschrift mit phosphatgepufferter Lösung zum Entfernen des überschüssigen Fixationsmediums wurde das Gewebe zur Kryoprotektion für 24 Stunden in 30 %ige Saccharoselösung überführt. Danach erfolgte die Einbettung mit Tissue-Tek-Medium (Sakura, Alphen aan den Rijn, Niederlande). Die Augen wurden mit flüssigem Stickstoff tief gefroren und bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden am Gefriermikrotom (Leica CM 3050S, Wetzlar) 20 µm dicke, koronare Kryogewebsschnitte durch die gesamte Retina hergestellt und auf Objektträger (Menzel Superfrost, Braunschweig) aufgezogen. Die Aufbewahrung erfolgte bei minus 20 °C.

Die Objektträger wurden zunächst für 45 Minuten bei 37 °C getrocknet und anschließend mit 4 %igen PFA für 20 Minuten fixiert. Anschließend erfolgten 2 Waschschriffe mit PBS, um das überschüssige Fixationsmedium zu entfernen. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Schnitte 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Blockierungslösung inkubiert. Die hierzu verwendete Lösung bestand aus 10 %igen Normalserum in 3 % Rinderserumalbumin (BSA). Zur Erhöhung der Zellpermeabilität enthielt sie, wie alle anderen Verdünnungslösungen auch, 0,3 % Triton X-100 (Sigma, Taufkirchen). Als Normalseren kamen in Abhängigkeit von der Ursprungsspezies des Primärantikörpers Normales Eselserum (NDS, Chemicon, Hofheim) und Normales Ziegenserum (NGS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) zum Einsatz. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C. Dieser wurde in 2 %igen Normalserum in 3 % BSA gelöst. Initial wurde der Antikörper *Mouse-anti-CD11b* (OX42, Serotec, Oxford, UK, Tab. 2) verwendet. Hierbei handelt es sich um einen häufig angewendeten Marker für Mikrogliazellen/Makrophagen, der an das Oberflächenmolekül CD11b (Synonym: C3b-Rezeptor) der Zellmembran dieser Zellen bindet und dem Nachweis von Mikrogliazellen/Makrophagen, unabhängig von ihrem Aktivierungszustand, dient. Anschließend sollte die Produktion des klassischen proinflammatorischen Zytokins IL-1β im Rahmen der TRI untersucht werden. Der hierzu verwendete Antikörper *Goat-anti-IL-1β* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA, Tab. 2) bindet das C-terminale Ende des IL-1β der Ratte. Der Nachweis IL-1β-exprimierender Zellen gelang, so dass zur Identifizierung des Zelltyps weitere Kombinationsfärbungen

angeschlossen wurden. Die hierzu verwendeten Antikörper dienten dem Nachweis von Mikrogliazellen/Makrophagen (OX42) und Astrozyten (*Rabbit-anti-GFAP*, Dako, Glostrup, Dänemark, Tab. 2).

Am folgenden Tag wurden ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit phosphatgepufferter Lösung entfernt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation der Schnitte mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:1000, in 10 % Normalserum in 3 % BSA) bei Raumtemperatur. Als Fluorochrome fanden Alexa Fluor 488 nm (MoBiTec, Göttingen, Tab. 2) und Rhodamine Red 554 nm (Jackson IR, West Grove, USA, Tab. 2) Verwendung. Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS für jeweils 10 Minuten entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schnitte mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma, Taufkirchen, 1 µg/ml in PBS) für 3 Minuten. Die selektive Bindung von DAPI an die DNA (Abb. 7 A) und die Bildung fluoreszierender, nukleärer DNA-DAPI-Komplexe erlaubte die sichere Identifikation kernhaltiger Retinaschichten (Abb. 7 B) und erleichterte die Lokalisation fluorochrommarkierter Zellen innerhalb der Retina (Abb. 7 C).



**Abbildung 7:** (A) Schematische Darstellung der Bindung von DAPI an die kleine Furche der DNA, modifiziert nach Larsen und Mitarbeitern (Larsen et al. 1989). (B) Identifikation der Retinaschichten nach Färbung mit DAPI. (C) Lokalisation OX42-positiver Zellen (Pfeile) in der inneren plexiformen Schicht. (ONL = äußere Körnerschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht)



Abschließend wurden die Schnitte ein letztes Mal über 15 Minuten mit PBS gewaschen und mit Mowiol (Calbiochem, Nottingham, UK) eingedeckt. Um die Spezifität des Fluoreszenzsignals sicher zu stellen, mussten Färbekontrollen mitgeführt werden, welche dieselbe Behandlung wie die anderen Schnitte erhielten, jedoch nicht mit Primärantikörper inkubiert wurden. Nachdem die Objektträger über Nacht getrocknet waren, konnten die Schnitte ausgewertet werden. Dies erfolgte am Mikroskop Axioplan 2 (Zeiss, Jena) in 40facher Vergrößerung. Zur Quantifizierung der Mikrogliazellen/Makrophagen wurde die Anzahl der OX42-positiven Zellen pro Schnitt bestimmt. Hierzu wurden die fluorochrommarkierten Zellen der inneren Retinaschichten (*GCL*, *IPL*, *INL*) von 10 Schnitten pro Retina (dies entspricht jedem 15. Schnitt) gezählt. Die Charakterisierung der Morphologie und Lokalisation der OX42-positiven Zellen erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Jena). Zur Beurteilung der Anzahl IL-1 $\beta$ -positiver Zellen wurden 8 Schnitte pro Zeitpunkt/Gruppe ausgewertet und die semiquantitative Angabe als keine, einzelne, zahlreiche oder massenhaft positive Zellen pro Schnitt (Tab. 3) gewählt. Die Phänotypisierung der nach Ischämie auftretenden IL-1 $\beta$ -positiven Zellen erfolgte am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM 510, Zeiss, Jena) bei 40facher Vergrößerung. Die Fluorochrome der sekundären Antikörper (*Alexa Fluor* [488 nm] und *Rhodamine Red* [554 nm]) sowie des zur Zelllokalisierung verwendeten DAPI (405 nm) wurden durch die entsprechenden Laser (Argon, Helium Neon 1 und Diode 405) angeregt. In der Bildverarbeitung wurden die gescannten Ebenen eines Schnittes übereinander gelegt und durch Kolo-kalisation der Fluoreszenzsignale die einzelnen Zelltypen identifiziert.

**Tabelle 2:** Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung	Normalserum
<b>Primäre Antikörper</b>			
<i>Mouse-anti-CD11b</i>	Serotec	1:100	2 % NGS
<i>Goat-anti-IL-1<math>\beta</math></i>	Santa Cruz Biotech.	1:100	2 % NDS
<i>Rabbit-anti-GFAP</i>	Dako	1:500	2 % NDS
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
<i>Alexa Fluor 488-anti-mouse</i>	MoBiTec	1:1000	10 % NDS
<i>Alexa Fluor 488-anti-goat</i>	MoBiTec	1:1000	10 % NDS
<i>Rhodamine red-anti-rabbit</i>	Jackson IR	1:1000	10 % NDS

**Tabelle 3:** Semiquantitative Beurteilung der Anzahl IL-1 $\beta$ -positiver Zellen. <sup>1</sup>positiver Zellen pro Schnitt

Bezeichnung	Anzahl <sup>1</sup>	Symbol
keine	0	-
einzelne	10 bis 50	+
zahlreiche	50 bis 100	++
massenhaft	mehr als 100	+++

## 4.8 RNA-Extraktion aus der Retina

Der *Bulbus* wurde wie oben beschrieben präpariert (vgl. 4.6) und die Retina wurde vom Rest des Augenbechers separiert. Die RNA-Extraktion aus der Netzhaut erfolgte mit Hilfe des *RNeasy micro kits* (Qiagen, Hilden), wobei die RNA zunächst an der Säule adsorbiert und Kontaminationen in mehreren Waschschritten entfernt wurden. Hierzu wurde das Gewebe zerkleinert und in 350  $\mu$ l Lyse-Puffer (1 ml RLT und 10  $\mu$ l 2-Mercaptoethanol [Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA]) mit einem Dispergierer (Ultra-Turrax, IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Zu jeder Probe mussten 350  $\mu$ l 70 %iges Ethanol gegeben und durch Pipettieren vermischt werden. Die mit Ethanol versetzte Probe wurde in ein Teströhrchen auf eine RNA-Säule aufgetragen und anschließend 15 Sekunden lang bei 10.000 rpm

zentrifugiert. Danach wurden 350 µl Waschpuffer auf jede Säule gegeben und diese erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ausgeschüttet und die Proben für 15 Minuten mit 80 µl einer Lösung, bestehend aus 70 µl RDD-Puffer und 10 µl *DNAse* Stock Lösung, bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten ein zweiter Waschschrift mit 350 µl Waschpuffer und eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 15 sec. Die Säulen wurden in neue Teströhrchen gegeben und 500 µl RPE-Waschpuffer (mit Ethanol versetzt) hinzugefügt, bevor sie bei 10.000 rpm 15 sec zentrifugiert wurden. Der Durchfluss wurde ausgeschüttet, auf jede Probe 500 µl 80 %iges Ethanol pipettiert und die Säulen 15 sec lang bei 10.000 rpm zentrifugiert. Um im letzten Schritt die *RNA* aus den Säulen zu eluieren, mussten diese in ein neues Teströhrchen gegeben und nach Zugabe von 14 µl *RNAse*-freiem Wasser 1 Minute lang bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert werden. Der Durchfluss und die darin enthaltene aufgereinigte *RNA* wurden bei -80 °C aufbewahrt.

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) der Proben erfolgte am UV/Visible-Spektralphotometer (NanoDrop 1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen). Hierzu wurde 1 µl unverdünnte Probe direkt auf die Messoberfläche gegeben und die UV-Absorption bei 260/280 nm gemessen. Anschließend erfolgte in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration die Standardisierung der *RNA*-Menge der Proben auf 1 µg/15 µl durch Zugabe der entsprechenden Menge an *RNAse*-freiem Wasser.

## 4.9 cDNA-Synthese

Die Synthese von *cDNA* aus der gewonnenen *RNA* erfolgte unter Verwendung einer Reversen Transkriptase (*RNA*-abhängige *DNA*-Polymerase) und des iScript *cDNA Synthese Kits* (Bio-Rad, München). Pro Probe wurden 1 µg totale *RNA*-Menge in *RNAse*-freiem Wasser (Gesamtvolumen 15 µl) mit 4 µl Reaktionsansatz (5 x iScript Reaction Mix, Bio-Rad, München) und 1 µl iScript Reverse Transkriptase (Bio-Rad, München) inkubiert. Die *cDNA*-Synthese erfolgte im Thermozykler (Biometra, Göttingen) entsprechend dem folgenden Protokoll: Inkubation für 5 min bei 25 °C, Transkription für 30 min bei 42 °C, Stoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 85 °C und abschließendes Abkühlen der Proben auf 4 °C. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20 °C.

#### 4.10 Polymerase-Kettenreaktion

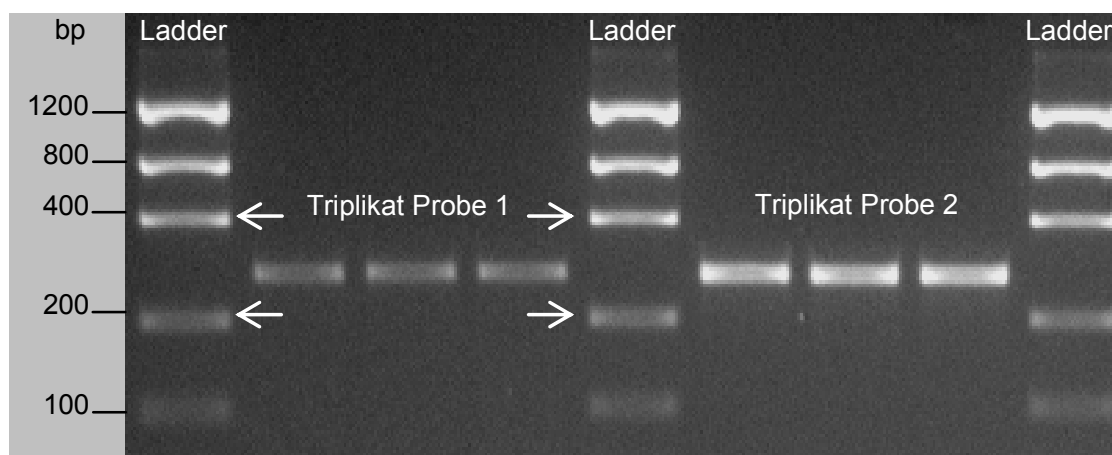
Zur Vervielfältigung der spezifischen *cDNA*-Produkte für die Zytokine *IL-1 $\beta$*  und *TNF $\alpha$*  wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt (Saiki et al. 1988). Der 24  $\mu$ l Reaktionsansatz bestand aus 12  $\mu$ l *RNAse*-freiem Wasser, 10  $\mu$ l *Master Mix* (Eppendorf, Hamburg) und 2  $\mu$ l Primerpaaren (*PCR*-Startmoleküle). Der *Master Mix* enthielt Desoxyribonukleotid-triphosphate, Taq-Polymerase, Pufferlösung und Magnesiumionen. Für jede Probe wurde 1  $\mu$ l *cDNA template* zugegeben. Die Sequenzen der verschiedenen Gene wurden in einem Thermozykler (Biometra, Göttingen), entsprechend dem allgemein gültigen Ablauf (Denaturierung, Primerhybridisierung, Elongation) amplifiziert. Als *housekeeping*-Gen wurde *Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase* (*GAPDH*) verwendet. Die Sequenzen der Primerpaare für *TNF $\alpha$* , *IL-1 $\beta$*  und *GAPDH* sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die für den Zytokinnachweis bestimmten Proben wurden mittels eines dreistufigen Programms amplifiziert, beginnend mit 30 sec bei 94 °C, gefolgt von 45 sec bei 60 °C und 60 sec bei 72 °C. Für *IL-1 $\beta$*  wurde dieser Zyklus 34-mal, für *TNF $\alpha$*  32-mal durchlaufen. Die Amplifikation des Produkts für *GAPDH* erfolgte nach folgendem Protokoll: 45 sec bei 94 °C, gefolgt von 45 sec bei 59°C und 60 sec bei 72 °C (39 Zyklen).

**Tabelle 4:** Verwendete Primer

	verwendete Primersequenz	Fragmentgröße (Referenz)
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	5'-AAGCTCTCCACCTCAATGGACAG-3' 3'-CTCAAACCTCCACTTTGGTCTTGA-5'	260 bp (Wang et al. 2005)
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	5'-CACGCTCTTCTGTCTACTGA-3' 3'-GGACTCCGTGATGTCTAAGT-5'	568 bp (Bhat et al. 1998)
<i>GAPDH</i>	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' 3'-AGATCCACAACGGATACATT-5'	308 bp (Kobori et al. 2001)

Die Auftrennung der Proben erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese in horizontalen Flachbett-Apparaturen. Hierzu wurden 2 %ige Agarosegele in Tris Acetat EDTA-Puffer (TAE) hergestellt. Ein großes Gel bestand aus 250 ml 1fach TAE, 5 g Agarose (Invitrogen, Karlsruhe) und 7,5  $\mu$ l Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen). Die Proben wurden zur Beschwerung der *DNA* vor dem Auftragen

mit *loading dye* (Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt. Pro Tasche wurden 5 µl des *PCR*-Reaktionsproduktes aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im TAE-Puffer bei konstanter Spannung von 100 V. Die im Gel aufgetrennten *DNA*-Fragmente wurden mittels UV-Licht (230 nm) sichtbar gemacht. Sowohl die Größenbestimmung der *DNA*-Fragmente als auch die Messung der in der Probe enthaltenen Menge an *DNA*-Fragment erfolgte durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Größe und *DNA*-Konzentration eines mit aufgetragenen *DNA*-Standards (*Low DNA Mass Ladder*, Invitrogen, Karlsruhe). Um ein reproduzierbares Ergebnis zu erzielen, wurde jede Probe als Triplikat aufgetragen und die angrenzenden Taschen mit einer definierten Menge *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen, Karlsruhe) beladen. Die Bestimmung der *cDNA*-Menge erfolgte mit Hilfe der Programme *Liscap image capture* und *ImageMaster TotalLab* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) durch Vergleich der Intensität der Probenbande mit den Intensitäten der an die Probe angrenzenden *Mass Ladder* Banden (Abb. 8) und wurde als Mittelwert der drei Einzelmessungen angegeben.

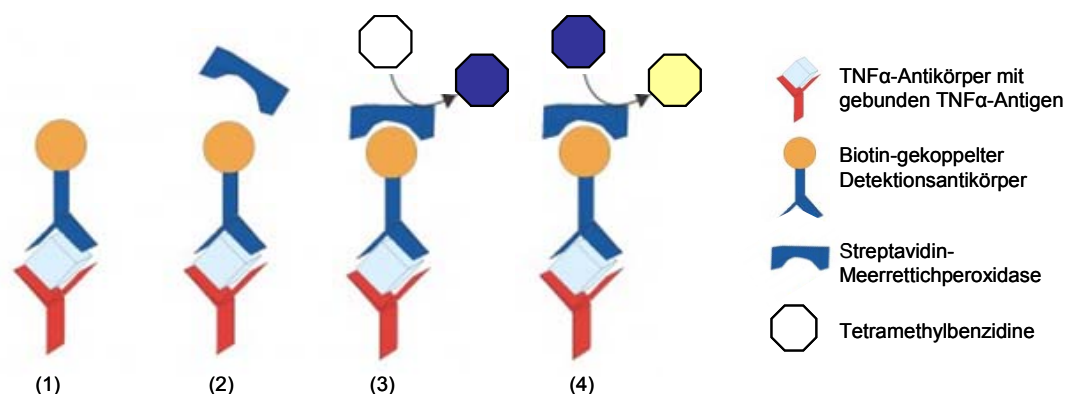


**Abbildung 8:** Die Bestimmung der in der Probe enthaltenen Menge an *DNA*-Fragment erfolgte durch Intensitätsvergleich der Probenbanden mit den angrenzenden Banden des *Low DNA Mass Ladders*. Pfeile kennzeichnen Referenzbanden für Probe 1.

#### 4.11 Enzyme-linked immunosorbent assay

Zur Bestimmung des retinalen TNF $\alpha$ -Gehaltes wurde ein *enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)* eingesetzt. Die Vorbereitung der Proben erfolgte in modifizierter Form nach (Nakazawa et al. 2006). Hierzu musste der *Bulbus* präpariert (vgl. 4.6) und die Retina vom Rest des Augenbechers separiert werden. Jede Retina wurde in 100  $\mu$ l steriles PBS mit Proteaseinhibitor (Complete Mini, Roche, Mannheim) gegeben und 15 sec lang mittels Ultraschall zerkleinert (Sonoplus, Bandelin, Berlin). Anschließend wurden die Proben 10 min bei 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand konnte in ein neues Teströhrchen pipettiert und die totale Proteinkonzentration mit der *Bradford-Methode* bestimmt werden. Der hierzu verwendete Farbstoff *Coomassie-Blau* (Quick Start Bradford Reagenz, BioRad, München) reagierte mit den basischen Aminosäuren der Probe, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums hin zu 595 nm führte. Durch Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge und Vergleich mit einer Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden. Zur *in vitro* Quantifizierung des TNF $\alpha$  wurde ein Sandwich-*ELISA* (Abb. 9) der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Dieser beruhte auf der Verwendung zweier Antikörper (AK), die beide spezifisch, aber an unterschiedlichen Stellen an das nachzuweisende Antigen (AG) banden. Im ersten Schritt wurden 100  $\mu$ l Standard, Kontrollen oder verdünnte Proben, in die mit TNF $\alpha$ -spezifischen Antikörpern beschichteten Vertiefungen (*wells*) der Mikrotiterplatte (erster, festphasengebundener Antikörper) gegeben und mit 50  $\mu$ l antigen-spezifischen Biotinkonjugat (zweiter, Detektionsantikörper) vermischt. Während der 1,5-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur kam es zu einer Bindung des in der Probe enthaltenen TNF $\alpha$ -Antigens an die antikörperhaltige Festphase. Des Weiteren erfolgte die Anlagerung des biotinylierten Detektionsantikörpers an den gebundenen AG-AK-Komplex. Durch 4-maliges Waschen mit Waschpuffer konnte der ungebundene zweite Antikörper entfernt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase-haltiger Lösung (100  $\mu$ l pro *well*) für 45 min bei Raumtemperatur. Streptavidin wurde an das Biotin des Detektionsantikörpers gebunden, wodurch ein enzymgekoppelter AK-AG-AK-Komplex („*Sandwich*“) entstand. Überschüssiges Enzym wurde durch 4-maliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Im dritten Inkubationsschritt wurden 100  $\mu$ l

stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidine, TMB) in die *wells* gegeben. Meerrettichperoxidase katalysierte die Oxidation von TMB, was zu einer sichtbaren Blaufärbung führte. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 N Schwefelsäure gestoppt, sichtbar an einem Farbumschlag von blau zu gelb. Die Intensität der entstandenen Farblösung war direkt proportional zur TNF $\alpha$ -Konzentration der Probe.



**Abbildung 9:** Prinzip des verwendeten Sandwich-ELISA. (1) Bindung des Biotin-gekoppelten Detektionsantikörpers an das festphasengebundene TNF $\alpha$ -Antigen. (2) Bindung der Streptavidin-Meerrettichperoxidase an das Biotin. (3) Oxidation des Chromogens durch die Peroxidase und sichtbare Blaufärbung. (4) Stopp der Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure, Farbumschlag von blau zu gelb.

Die Messung der Extinktion erfolgte am Mikrotiterplatten-Reader (MWG Biotech, Ebersberg) bei 450 nm innerhalb einer Stunde nach Beendigung der Reaktion. Alle Schritte wurden protokollgerecht durchgeführt. Pro Probe wurden 100 µg Gesamtprotein je *well* aufgetragen. Kontrollen, Standards und Proben wurden als Duplikat geführt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der Probenextinktion mit der Extinktion einer Standardreihe nach Abzug des Hintergrundsignals. Alle Werte wurden semiquantitativ als Prozent von Kontrollen (Kontrolle = 100 %) angegeben.

## 4.12 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 11.5. Die statistische Analyse erfolgte bei ungepaarten, nicht normalverteilten Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test ( $p < 0,05$ ).

## 4.13 Verwendete Lösungen

### Phosphatgepufferte Normalsalzlösung (PBS); 10fach

Natriumchlorid	80,6 g	(Roth, Karlsruhe)
Kaliumchlorid	2,0 g	(Merck, Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	17,8 g	(Merck, Darmstadt)
Dikaliumhydrogenphosphat	2,7 g	(Merck, Darmstadt)

mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

### Phosphatgepufferte Normalsalzlösung (PBS); 1fach

100 ml 10-fach PBS mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnen

### Paraformaldehydlösung (PFA); 4 %

Paraformaldehyd	40 g	(Riedel-de-Häen, Seelze)
PBS	1000 ml	

auf 60 °C erhitzen und tropfenweise Natronlauge hinzufügen bis sich das Salz auflöst (pH 7,3 bis 7,4).

### Saccharoselösung; 30 %

Saccharose	30 g	(Roth, Karlsruhe)
PBS	100 ml	

### Chloralhydrat; 7 %

Chloralhydrat purum	7 g	(Sigma, Taufkirchen)
PBS	100 ml	

### Chloralhydrat; 30 %

Chloralhydrat purum	30 g	(Sigma, Taufkirchen)
PBS	100 ml	

### Rinderserumalbumin (BSA); 3 %

Rinderserumalbumin	3 g	(Serva, Heidelberg)
PBS	100 ml	



**Tris Acetat EDTA-Puffer (TAE); 50fach**

Tris Base	242 g	(Roth, Karlsruhe)
Eisessig	57,1 ml	(Roth, Karlsruhe)
0,5M EDTA (pH 8)	100 ml	(Sigma, Taufkirchen)

mit destilliertem Wasser auf 1000 ml auffüllen

**Tris Acetat EDTA-Puffer (TAE); 1fach**

20 ml 50fach TAE mit 980 ml destillierten Wasser verdünnen

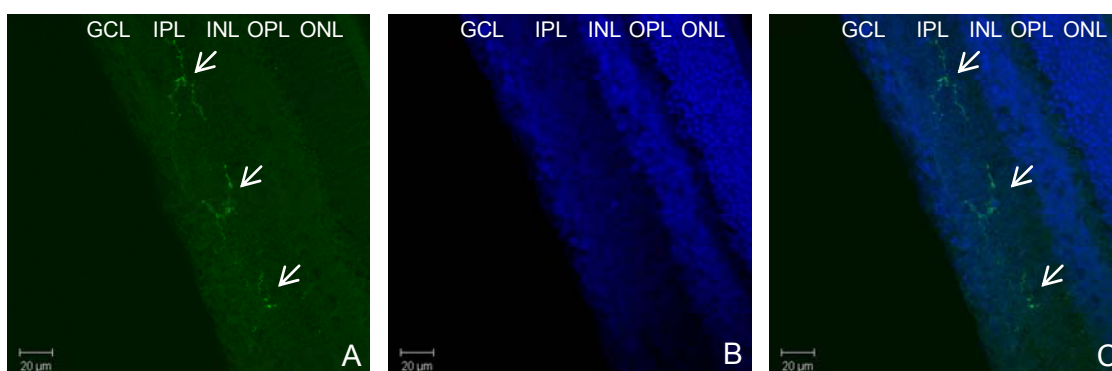
## 5. ERGEBNISSE

### 5.1 Mikrogliaaktivierung nach transienter retinaler Ischämie

#### 5.1.1 OX42-positive Zellen sind Bestandteil der nicht-ischämischen Retina

Zur Beurteilung des physiologischen Ausgangszustandes wurde initial eine immunhistochemische Färbung der Mikrogliazellen/Makrophagen der nicht-ischämischen Retina mit dem Antikörper *Mouse-anti-CD11b* (OX42, vgl. Tab. 2) durchgeführt. Untersucht wurde die Anzahl markierter Zellen pro Schnitt, ihre Morphologie und die Lokalisation innerhalb der Retina. Alle Werte sind als MW  $\pm$  SEM angegeben.

In der nicht-ischämischen Retina fanden sich einige ( $124 \pm 5$ ), schwach anfärbbare OX42-positive Zellen pro Schnitt (Abb. 10). Diese Zellen bestanden aus einem ovalen, ca. 10  $\mu\text{m}$  großen Zellkern sowie langen, verzweigten, nicht miteinander anastomosierenden Fortsätzen. Im Weiteren werden sie als dendritische Zellen bezeichnet (Streit et al. 1999, Zhang et al. 2005a). OX42-positive Zellen fanden sich ausschließlich in den inneren Retinaschichten (INL, IPL, GCL), wobei der größte Teil in der inneren plexiformen Schicht lokalisiert war (Abb. 10).



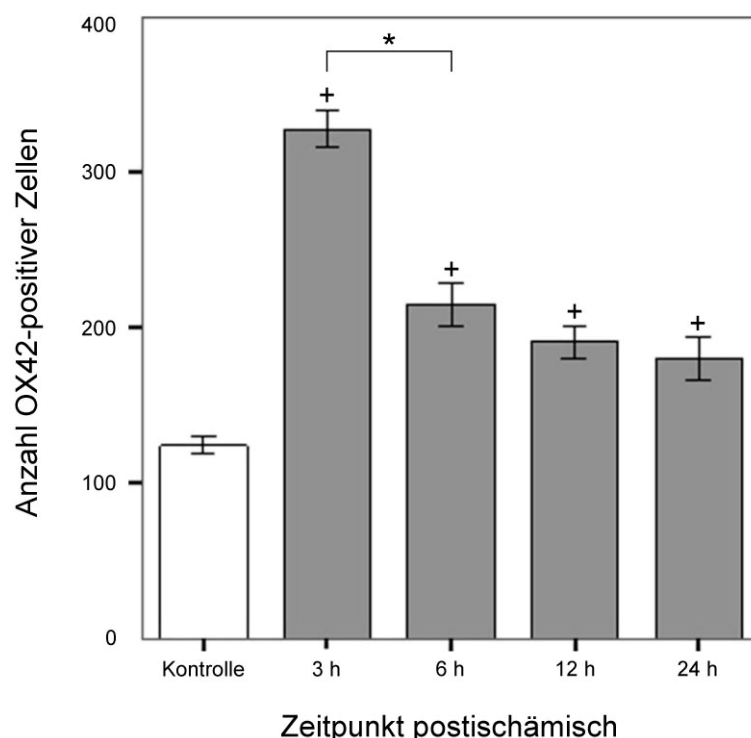
**Abbildung 10:** Verteilung OX42-positiver Zellen (Pfeile) bei Kontrolltieren. Die nicht-ischämische Retina ist durch das Vorhandensein weniger, schwach anfärbbarer, dendritischer Zellen gekennzeichnet. (A) OX42. (B) DAPI. (C) Doppelfärbung OX42 und DAPI.

### 5.1.2 Nach transienter retinaler Ischämie kommt es zu einer Zunahme der Anzahl OX42-positiver Zellen

Nach transienter retinaler Ischämie war ein Anstieg der Zahl OX42-positiver Zellen in der inneren Retina zu verzeichnen. Drei Stunden postischämisch erreichte die Zellzahl mit 264 Prozent, bezogen auf Kontrollen ( $p < 0,05$ ), ihr Maximum. Nachfolgend war ein kontinuierlicher Rückgang der Anzahl OX42-positiver Zellen innerhalb des ersten Tages nach TRI bis auf 145 %, bezogen auf Kontrollen ( $p < 0,05$ ), nachweisbar. Die Werte blieben 24 h postischämisch gegenüber Kontrollen signifikant erhöht (Tab. 5, Abb. 11).

**Tabelle 5:** Anzahl OX42-positiver Zellen pro Schnitt. <sup>1</sup> Zeitpunkt postischämisch, <sup>2</sup> Mittelwert  $\pm$  SEM

Gruppe	Kontrolle	3 h <sup>1</sup>	6 h <sup>1</sup>	12 h <sup>1</sup>	24 h <sup>1</sup>
Zellzahl <sup>2</sup>	123,93 $\pm$ 5,44	327,38 $\pm$ 11,79	214,74 $\pm$ 14,46	190,73 $\pm$ 10,65	179,98 $\pm$ 13,84

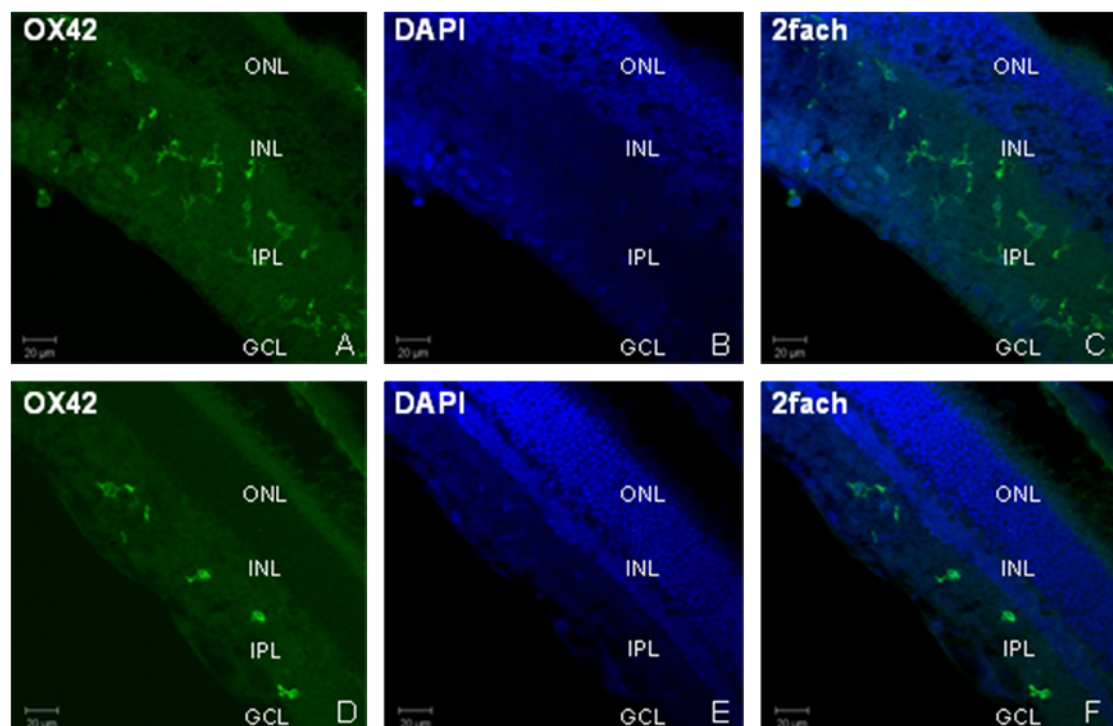


**Abbildung 11:** Anzahl OX42-positiver Zellen pro Schnitt bei Kontrolltieren und zu verschiedenen Zeitpunkten postischämisch. 3 Stunden nach TRI war ein Anstieg der Zellzahl auf  $327,38 \pm 11,79$  zu verzeichnen. Innerhalb des ersten Tages kam es, ausgehend von diesem Maximum, zu einem kontinuierlichen Rückgang der Zellzahl. Die Werte blieben auch 24 h postischämisch gegenüber Kontrollen signifikant erhöht. + =  $p < 0,05$  vs. Kontrollen; \* =  $p < 0,05$  (MW ± SEM; Mann-Whitney-U-Test)

### 5.1.3 Die postischämische Mikrogliaaktivierung geht mit charakteristischen Änderungen der Zellmorphologie einher

Postischämisch wurde neben der ubiquitären Vermehrung OX42-positiver Zellen in den inneren Retinaschichten eine stärkere Anfärbbarkeit der Mikrogliazellen/Makrophagen beobachtet. Darüber hinaus kam es nach TRI zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellen (Abb. 12). Auffallend war, dass es sich hierbei um ein dynamisches Geschehen handelte, bei dem innerhalb der ersten 24 h nach Beendigung der Ischämie unterschiedliche Entwicklungs- und Aktivierungsstufen durchlaufen wurden. Drei Stunden nach TRI fanden sich vielgestaltige Zellen, welche durch unterschiedlich große, teils

hypertrophe Zellkerne und eine beginnende Retraktion der Fortsätze gekennzeichnet waren (Abb. 12: A-C). Folglich werden diese als amöboide Zellen bezeichnet (Streit et al. 1999, Zhang et al. 2005a). Eine ähnliche Morphologie wiesen die OX42-positiven Zellen 6 h postischämisch auf. 12 h nach Beendigung der Ischämie dominierten stark gefärbte, runde Zellen mit wenigen, kurzen, nicht verzweigten Fortsätzen das Bild (Abb. 12: D-F). Diese werden im Folgenden als runde Mikrogliazellen/Makrophagen bezeichnet (Streit et al. 1999).

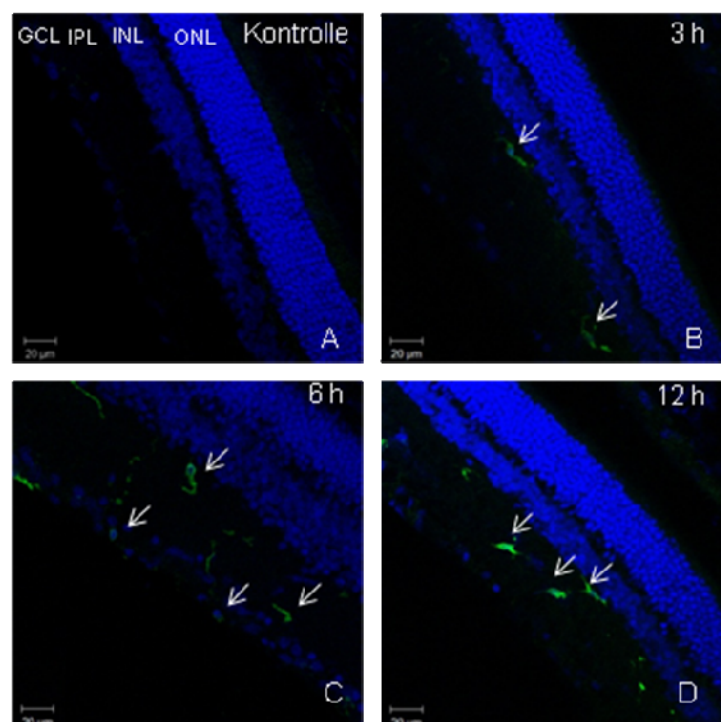


**Abbildung 12:** Verteilung OX42-positiver Zellen in der inneren Retina nach TRI. (A-C) 3 h postischämisch: Zunahme der Anzahl positiver Zellen, bezogen auf Kontrollen, und Umwandlung in die amöboide Form. (D-F) 12 h nach TRI: Rückgang der Anzahl gefärbter Zellen, verglichen mit (A-C), und Übergang in die runde Form.

#### 5.1.4 Transiente retinale Ischämie führt zum Auftreten IL-1 $\beta$ -positiver Zellen in der Retina

Zur Prüfung einer Beteiligung des klassischen proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  an der akuten Entzündungsreaktion nach TRI wurde das Vorhandensein IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen in der Retina evaluiert. Hierzu wurden die Schnitte mit einem gegen das C-terminale Ende des Ratten-IL-1 $\beta$  gerichteten Antikörper (vgl. Tab. 2)

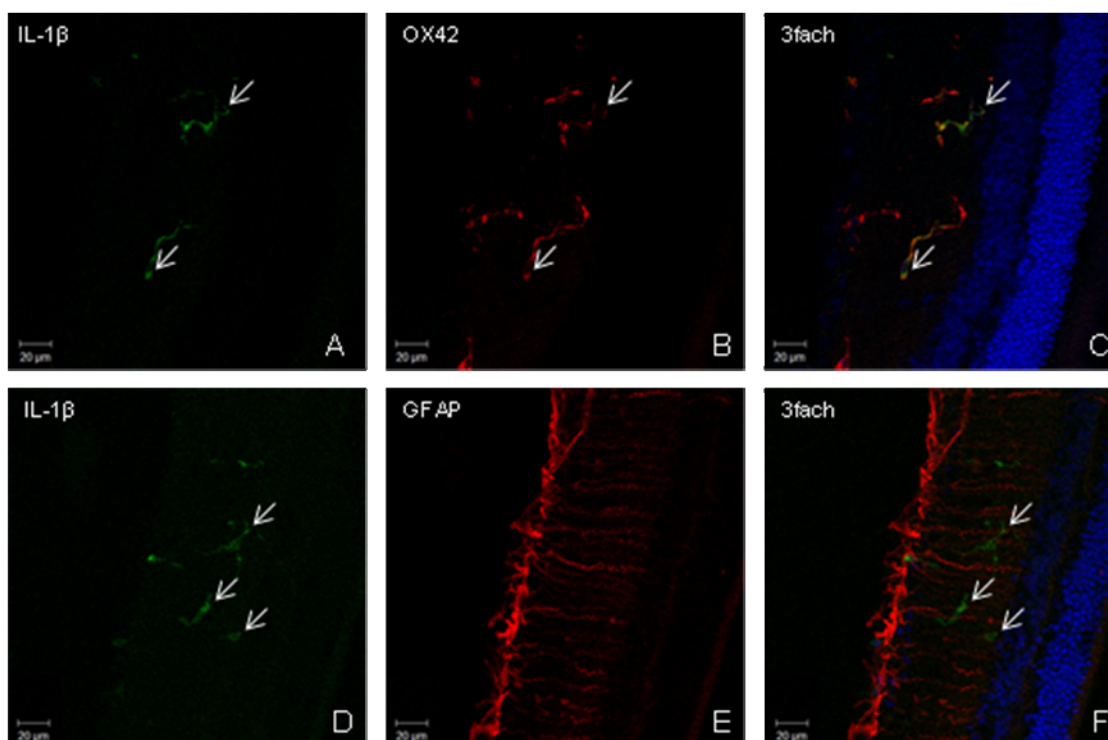
gefärbt. Es erfolgte eine semiquantitative Beurteilung der Zellzahl, wobei die Einteilung entsprechend Tabelle 3 vorgenommen wurde (vgl. Tab. 3). In der nicht-ischämischen Retina waren keine (-) IL-1 $\beta$ -positiven Zellen nachweisbar (Abb. 13 A). 3 Stunden postischämisch konnte das Auftreten einzelner (+) positiver Zellen beobachtet werden (Abb. 13 B). Diese waren in der inneren Retina (INL, IPL, GCL) lokalisiert und zeichneten sich durch einen ovalen bis rundlichen Kern und einzelne, kurze, nicht verzweigte Fortsätze aus. Ihre Anzahl nahm mit Verlängerung des Zeitintervalls zur TRI zu, so dass sowohl 6 h (Abb. 13 C) als auch 12 h postischämisch (Abb. 13 D) zahlreiche (++) IL-1 $\beta$ -positive Zellen nachweisbar waren. Nach Durchlaufen dieses Plateaus war ihre Zahl rückläufig und bereits 24 h nach Beendigung der Ischämie waren keine IL-1 $\beta$ -positive Zellen mehr nachweisbar (-).



**Abbildung 13:** Auftreten IL-1 $\beta$ -positiver Zellen (Pfeile) nach TRI. Doppelfärbung IL-1 $\beta$  und DAPI. (A) In der nicht-ischämischen Retina waren keine (-) markierten Zellen nachweisbar. (B) 3 h postischämisch kam es zum Auftreten einzelner (+) positiver Zellen in der inneren Retina. (C-D) 6 h und 12 h nach Beendigung der Ischämie konnten zahlreiche (++) IL-1 $\beta$ -positive Zellen detektiert werden.

### 5.1.5 IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen sind OX42-positiv und GFAP-negativ

Im nächsten Schritt wurden die nach TRI auftretenden IL-1 $\beta$ -positiven Zellen typisiert. Aufgrund morphologischer Ähnlichkeit zu amöboiden OX42-positiven Zellen wurde zunächst eine Doppelfärbung für IL-1 $\beta$  und OX42 durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen auch OX42-positiv waren, jedoch nicht alle OX42-positiven Zellen auch IL-1 $\beta$  exprimierten (Abb. 14: A-C). Anschließend wurde untersucht, ob Astrozyten an der Produktion von IL-1 $\beta$  im Rahmen der TRI beteiligt waren. Der hierzu verwendete Antikörper *Rabbit-anti-GFAP* (vgl. Tab. 2) war gegen das saure Gliafaserprotein, ein zytoplasmatisches Intermediärfilament von Astrozyten, gerichtet. Eine Kolokalisation von IL-1 $\beta$  und GFAP ließ sich nicht nachweisen (Abb. 14: D-F).



**Abbildung 14:** 3fach Färbung zur Identifizierung IL-1 $\beta$ -produzierender Zellen. (A-C) IL-1 $\beta$ , OX42, DAPI. IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen sind OX42-positiv, aber nicht alle Mikrogliazellen/Makrophagen exprimieren IL-1 $\beta$ . (D-F) IL-1 $\beta$ , GFAP, DAPI. Eine Kolokalisation von IL-1 $\beta$  und GFAP ließ sich nicht nachweisen.

## 5.2 Produktion proinflammatorischer Zytokine nach transienter retinaler Ischämie

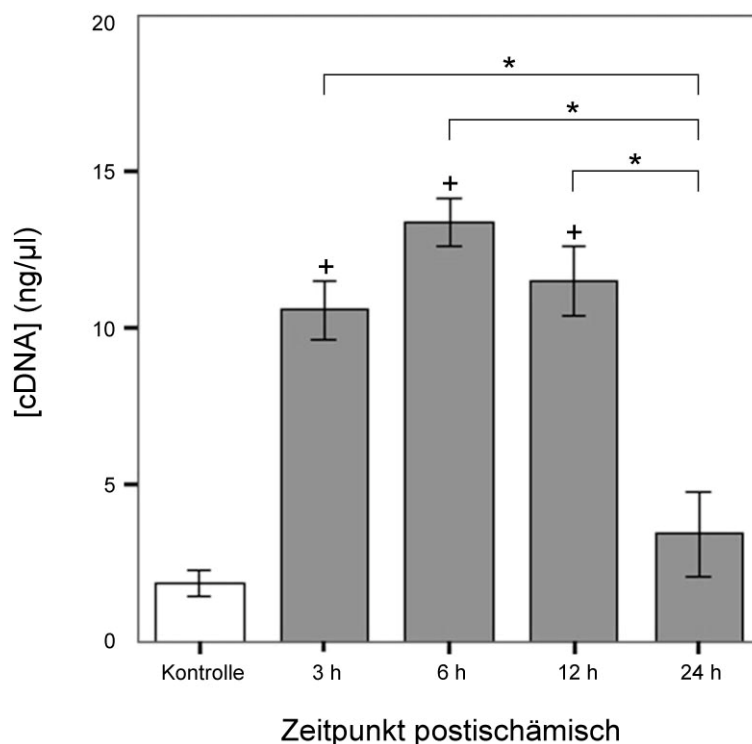
### 5.2.1 Transiente retinale Ischämie führt zu einem Anstieg der IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression zu frühen postischämischen Zeitpunkten

Infolge des Nachweises IL-1 $\beta$ -positiver Zellen nach TRI, wurde die IL-1 $\beta$ -Expression auf *mRNA*-Niveau untersucht. Hierzu wurde eine *RT-PCR* durchgeführt und die Menge an *IL-1 $\beta$ -cDNA* bei Kontrolltieren und zu verschiedenen Zeitpunkten postischämisch semiquantitativ bestimmt (Tab. 6, Abb. 15). In der nicht-ischämischen Retina fanden sich geringe basale Mengen an *IL-1 $\beta$*  ( $1,58 \pm 0,4$  ng/ $\mu$ l). TRI führte zu einer signifikanten Erhöhung der Spiegel an *IL-1 $\beta$ -cDNA* zu frühen postischämischen Zeitpunkten (3 h, 6 h, 12 h), verglichen mit den Basalwerten (Tab. 6). Dieser Anstieg war 3 h nach TRI nachweisbar ( $p < 0,05$ ), erreichte 6 h postischämisch, bezogen auf Kontrollen, sein Maximum ( $p < 0,05$ ) und blieb 12 h nach Beendigung der Ischämie bestehen ( $p < 0,05$ ). Die *IL-1 $\beta$ -cDNA*-Mengen zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 12 h nach TRI unterschieden sich nicht signifikant voneinander. 24 h nach retinaler Ischämie fiel die Menge an *IL-1 $\beta$ -cDNA*, im Vergleich zu den frühen postischämischen Zeitpunkten ab ( $p < 0,05$ ) und unterschied sich nicht mehr signifikant von den Basalwerten.

**Tabelle 6:** Semiquantitative Bestimmung der Menge an *IL-1 $\beta$ -cDNA*. <sup>1</sup> Zeitpunkt postischämisch, <sup>2</sup> in (ng/ $\mu$ l), <sup>3</sup> MW  $\pm$  SEM

Gruppe	Kontrolle	3 h <sup>1</sup>	6 h <sup>1</sup>	12 h <sup>1</sup>	24 h <sup>1</sup>
[ <i>IL-1<math>\beta</math>-cDNA</i> ] <sup>2,3</sup>	$1,58 \pm 0,40$	$10,58 \pm 0,95$	$13,38 \pm 0,74$	$11,47 \pm 1,11$	$3,43 \pm 1,35$





**Abbildung 15:** Menge an IL-1 $\beta$ -cDNA bei Kontrolltieren und nach TRI. Ausgehend von niedrigen basalen Spiegeln an IL-1 $\beta$ -cDNA, kam es postischämisch zu einem Anstieg der IL-1 $\beta$ -cDNA-Konzentration, nachweisbar 3 h, 6 h und 12 h nach TRI.

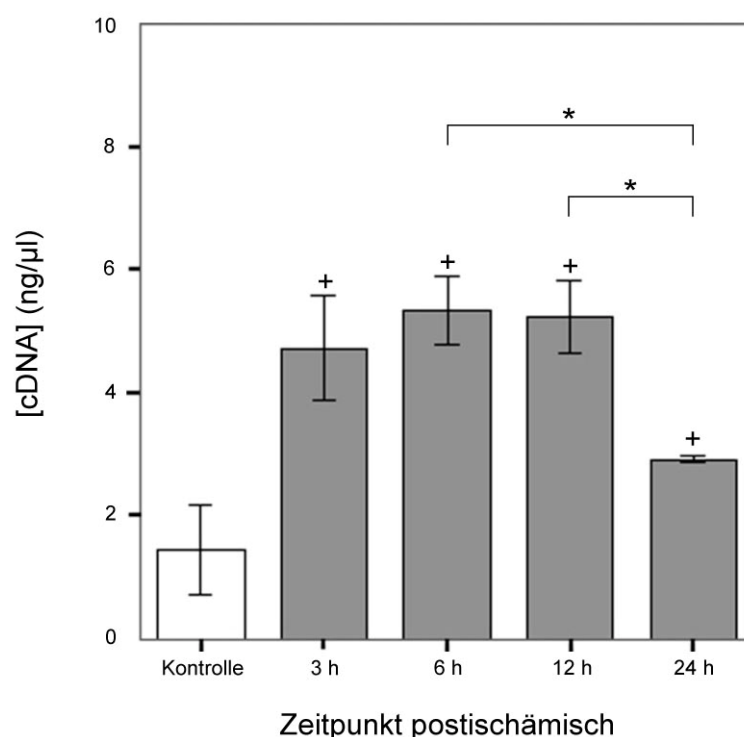
+ =  $p < 0,05$  vs. Kontrollen; \* =  $p < 0,05$  (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test)

### 5.2.2 Transiente retinale Ischämie führt zu einem Anstieg der Menge an TNF $\alpha$ -mRNA

Für eine umfassendere Analyse der akuten Entzündungsreaktion nach TRI wurde die Expression eines zweiten proinflammatorischen Zytokins untersucht. Hierzu wurde eine RT-PCR durchgeführt und die Menge an TNF $\alpha$ -cDNA bei Kontrolltieren und zu verschiedenen Zeitpunkten postischämisch semiquantitativ bestimmt (Tab. 7, Abb. 16). Bei Kontrolltieren fanden sich niedrige basale Mengen von TNF $\alpha$ -cDNA ( $1,08 \pm 0,63$  ng/μl). Drei Stunden postischämisch war ein signifikanter Anstieg der Spiegel an TNF $\alpha$ -cDNA, verglichen mit Basalwerten ( $p < 0,05$ ), zu verzeichnen. Die TNF $\alpha$ -cDNA-Konzentration erreichte zwischen 6 h und 12 h nach retinaler Ischämie ein frühes Maximum. 24 h nach TRI fiel die Menge an TNF $\alpha$ -cDNA bezogen auf den Zeitpunkt 12 h postischämisch ab ( $p < 0,05$ ) und blieb verglichen mit den Basalwerten leicht erhöht ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 7:** Semiquantitative Bestimmung der Menge an TNF $\alpha$ -cDNA. <sup>1</sup> Zeitpunkt postischämisch, <sup>2</sup> in (ng/ $\mu$ l), <sup>3</sup> MW  $\pm$  SEM

Gruppe	Kontrolle	3 h <sup>1</sup>	6 h <sup>1</sup>	12 h <sup>1</sup>	24 h <sup>1</sup>
[TNF $\alpha$ -cDNA] <sup>2,3</sup>	1,08 $\pm$ 0,63	4,00 $\pm$ 0,86	5,34 $\pm$ 0,55	5,22 $\pm$ 0,60	2,91 $\pm$ 0,06



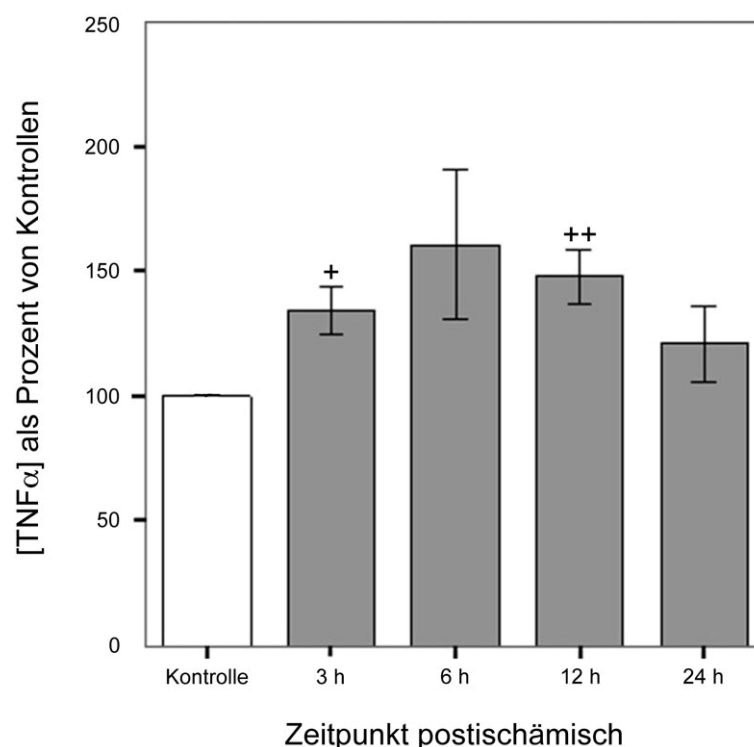
**Abbildung 16:** Konzentration der TNF $\alpha$ -cDNA bei Kontrolltieren und nach TRI. Ausgehend von niedrigen Basalwerten kam es nach retinaler Ischämie zu einer Zunahme der TNF $\alpha$ -cDNA-Spiegel. Diese erreichten zwischen 6 h und 12 h postischämisch ein frühes Maximum und waren 24 h nach TRI wieder rückläufig. + =  $p < 0,05$  vs. Kontrollen; \* =  $p < 0,05$  (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test)

### 5.2.3 Die $TNF\alpha$ -Proteinexpression spiegelt die Genexpression nach transienter retinaler Ischämie wider

Nach der Analyse der postischämischen  $TNF\alpha$ -Genexpression wurde geprüft, ob die auf *mRNA*-Niveau messbaren Unterschiede auch der Expression auf Proteinebene entsprechen. Die Bestimmung der retinalen  $TNF\alpha$ -Expression bei Kontrolltieren und zu verschiedenen Zeitpunkten postischämisch erfolgte mittels *ELISA* (vgl. 4.11). Alle Werte wurden semiquantitativ als Prozent von Kontrollen (Kontrolle = 100 %) angegeben (Tab. 8, Abb. 17). Drei Stunden nach TRI stieg die Menge an  $TNF\alpha$ -Protein auf 134 %, bezogen auf Kontrollen ( $p < 0,05$ ), und blieb 6 h und 12 h postischämisch, im Vergleich zu den Basalwerten, erhöht ( $p < 0,01$ ). Die  $TNF\alpha$ -Expression zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 12 h nach TRI unterschied sich nicht signifikant voneinander. 24 h nach Beendigung der Ischämie war ein signifikanter Unterschied zu den basalen Werten der Kontrolltiere nicht mehr nachweisbar.

**Tabelle 8:** Bestimmung der retinalen Proteinmenge an  $TNF\alpha$ . <sup>1</sup> Zeitpunkt postischämisch, <sup>2</sup> als Prozent von Kontrollen, <sup>3</sup>  $MW \pm SEM$

Gruppe	3 h <sup>1</sup>	6 h <sup>1</sup>	12 h <sup>1</sup>	24 h <sup>1</sup>
[ $TNF\alpha$ -Protein] <sup>2,3</sup>	134,49 $\pm$ 9,54	160,64 $\pm$ 30,22	147,85 $\pm$ 10,65	120,81 $\pm$ 15,17



**Abbildung 17:** Retinale  $TNF\alpha$ -Proteinkonzentration als Prozent von Kontrollen, gemessen mittels ELISA. Postischämisch kam es zu einer Steigerung der  $TNF\alpha$ -Konzentration. Die  $TNF\alpha$ -Spiegel zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 12 h nach TRI unterschieden sich nicht signifikant voneinander. + =  $p < 0,05$  vs. Kontrollen; ++ =  $p < 0,01$  vs. Kontrollen (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test)

### 5.3 Modulation der akuten Entzündungsreaktion durch Simvastatin

Im zweiten Teil der vorliegenden Studie wurde eine mögliche Modulation der inflammatorischen Antwort nach TRI durch Simvastatingabe evaluiert. Hierzu wurde den Tieren der Gruppe 3 (vgl. Abb. 5) eine Stunde postischämisch, 8 mg Simvastatin pro kg KG injiziert (vgl. 4.4). Zur Untersuchung des alleinigen Injektionseffekts, sowie einer möglichen Wirkung der zur Lösung des Simvastatins verwendeten Substanzen, erhielten die Tiere der Gruppe 4 (vgl. Abb. 5) eine Stunde postischämisch eine Vehikelinjektion (vgl. 4.5). Die E nukleation der *Bulbi* erfolgte 3, 6 und 12 Stunden postischämisch. Es wurden immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern *Goat-anti-IL-1 $\beta$*  (vgl. Tab. 2) und *Mouse-anti-*

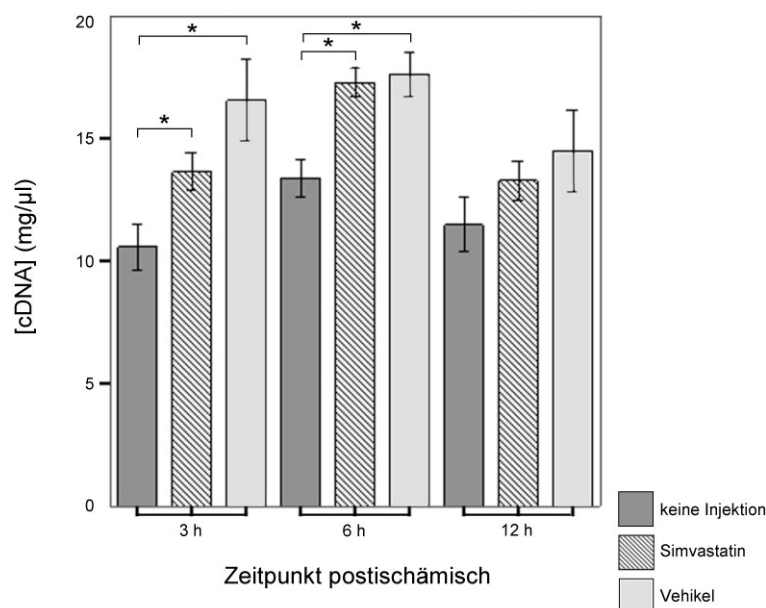
*CD11b* (OX42, vgl. Tab. 2), *RT-PCR* zur Bestimmung der *cDNA*-Spiegel von *IL-1 $\beta$*  und *TNF $\alpha$*  und *ELISA* zur Quantifizierung der retinalen *TNF $\alpha$* -Proteinmenge, analog zum ersten Teil der Studie, durchgeführt.

### 5.3.1 Die postischämische Injektion von Simvastatin oder Vehikel führt zu einem Anstieg der *IL-1 $\beta$* -mRNA-Spiegel

Der Einfluss der postischämischen Applikation von Simvastatin oder Vehikel auf die *IL-1 $\beta$* -mRNA-Spiegel nach TRI wurde analysiert. Die Untersuchung ergab, dass sowohl die Injektion des Statins als auch die Gabe des Vehikels zu einer Zunahme der Menge an *IL-1 $\beta$* -cDNA zu frühen postischämischen Zeitpunkten führte (Tab. 9, Abb. 18). Drei Stunden nach retinaler Ischämie war, verglichen mit Tieren der Gruppe 2, ein Anstieg der *IL-1 $\beta$* -cDNA-Konzentration nach Injektion von Simvastatin oder Vehikel messbar ( $p < 0,05$ ). Zwischen den Gruppen 3 und 4 ließ sich zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied feststellen. 6 h postischämisch kam es, verglichen mit Tieren ohne Injektion, sowohl nach Statin- als auch nach Vehikelgabe zu einer Erhöhung der *IL-1 $\beta$* -cDNA-Spiegel ( $p < 0,05$ ). Gruppe 3 und 4 unterschieden sich auch zum Zeitpunkt 6 h nach TRI nicht signifikant voneinander. 12 h nach Beendigung der Ischämie zeigte sich eine ähnliche Tendenz wie zu den früheren postischämischen Zeitpunkten. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 2, 3 und 4 zu diesem Zeitpunkt ergaben sich allerdings nicht.

**Tabelle 9:** Semiquantitative Bestimmung [*IL-1 $\beta$* -cDNA] in (ng/ $\mu$ l). <sup>1</sup> MW  $\pm$  SEM, <sup>2</sup> Zeitpunkt postischämisch

	keine Injektion <sup>1</sup>	Simvastatin <sup>1</sup>	Vehikel <sup>1</sup>
3 h <sup>2</sup>	10,58 $\pm$ 0,95	13,64 $\pm$ 0,77	16,55 $\pm$ 1,66
6 h <sup>2</sup>	13,38 $\pm$ 0,74	17,30 $\pm$ 0,60	17,62 $\pm$ 0,92
12 h <sup>2</sup>	11,47 $\pm$ 1,11	13,28 $\pm$ 0,78	14,49 $\pm$ 1,66

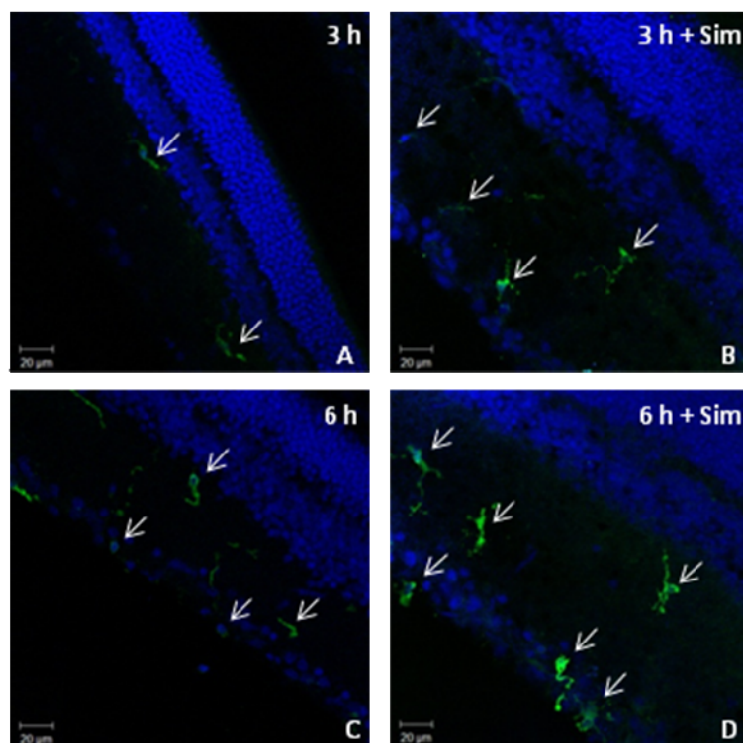


**Abbildung 18:** Beeinflussung der  $IL-1\beta$ -cDNA-Konzentration durch Simvastatin und Vehikel. Sowohl die Injektion des Statins, als auch die Gabe des Vehikels führt zu einer Zunahme der Menge an  $IL-1\beta$ -cDNA zu frühen postischämischen Zeitpunkten.

\* =  $p < 0,05$  (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test)

### 5.3.2 Simvastatin-Behandlung erhöht die Anzahl $IL-1\beta$ -positiver Zellen in der Retina

Dem Nachweis erhöhter  $IL-1\beta$ -cDNA-Spiegel nach Statininjektion zu den Zeitpunkten 3 h und 6 h postischämisch schlossen sich Untersuchungen an, um zu klären, ob diese Veränderungen auch auf zellulärer Ebene sichtbar sind. Hierzu wurden Gefrierschnitte der entsprechenden Gruppen mit *Goat-anti-IL-1 $\beta$*  (vgl. Tab. 2) inkubiert und die Anzahl positiver Zellen pro Schnitt semiquantitativ (vgl. Tab. 3) bestimmt. Nach Injektion von Simvastatin kam es, im Vergleich zu Tieren, die lediglich die TRI erhielten, zu einer Zunahme  $IL-1\beta$ -positiver Zellen in den inneren Retinaschichten. Fanden sich 3 h postischämisch bei Tieren der Gruppe 2 einzelne (+) positive Zellen (Abb. 19 A), so konnten nach Statingabe zum selben Zeitpunkt zahlreiche (++)  $IL-1\beta$ -exprimierende Zellen detektiert werden (Abb. 19 B). 6 h nach TRI stieg die Zahl  $IL-1\beta$ -positiver Zellen von zahlreichen (++) bei Gruppe 2 (Abb. 19 C) auf massenhaft (+++) bei Gruppe 3 (Abb. 19 D).



**Abbildung 19:** Verteilung IL-1 $\beta$ -positiver Zellen (Pfeile) in der inneren Retina. Doppelfärbung IL-1 $\beta$  und DAPI. (A) 3 h postschämisch waren einzelne (+) positive Zellen nachweisbar. (B) Nach Statininjektion stieg deren Zahl an. Zahlreiche (++) Zellen konnten detektiert werden. (C) 6 h nach TRI kam es zum Auftreten zahlreicher (++) IL-1 $\beta$ -positiver Zellen. (D) Die Gabe von Simvastatin erhöhte ihre Zahl auf massenhaft (+++) positive Zellen. (Sim = Simvastatin)

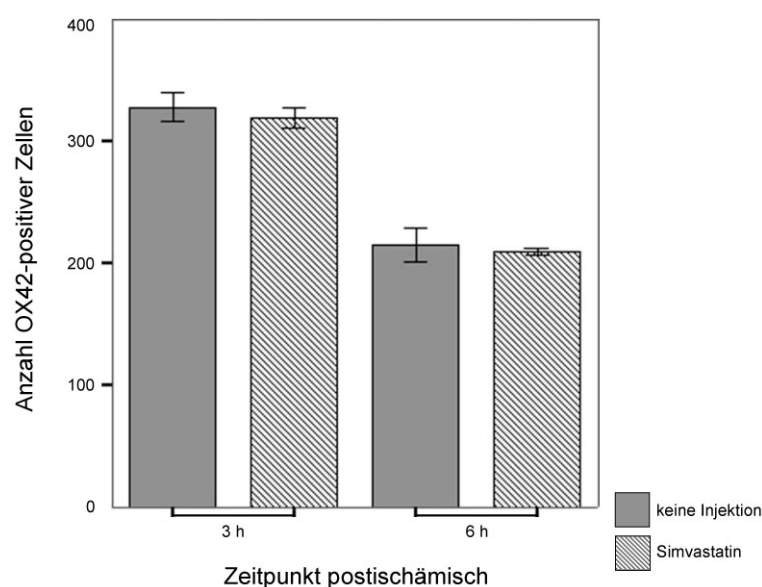
### 5.3.3 Die Anzahl OX42-positiver Zellen wird durch Simvastatininjektion nicht verändert

Nachdem IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen im ersten Teil der Studie nachweislich OX42-positiv waren (vgl. 5.1.5) und eine Zunahme der Zahl IL-1 $\beta$ -positiver Zellen nach Simvastatininjektion zu frühen postischämischen Zeitpunkten nachgewiesen werden konnte (vgl. 5.3.2), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Anzahl OX42-positiver Zellen nach Statingabe ebenfalls verändert wäre. Hierzu wurde die Menge an OX42-positiven Zellen pro Schnitt 3 h und 6 h postischämisch bei Tieren, welche Simvastatin erhielten, bestimmt und mit den zuvor ermittelten Werten der Gruppe 2 verglichen. Sowohl 3 h als auch 6 h nach TRI ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen den Gruppen mit und ohne Simvastatininjektion (Tab. 10, Abb. 20). Zellmorphologie, Anfärbbarkeit und

Lokalisation unterschieden sich nach Statingabe ebenfalls nicht wesentlich von den Gruppen, die nur die TRI erhielten.

**Tabelle 10:** Anzahl OX42-positiver Zellen pro Retinaschnitt. <sup>1</sup> Zeitpunkt postischämisch, <sup>2</sup> keine Injektion, <sup>3</sup> Simvastatin, <sup>4</sup> MW  $\pm$  SEM

	3 h <sup>1</sup> _Gr.2 <sup>2</sup>	3 h <sup>1</sup> _Gr.3 <sup>3</sup>	6 h <sup>1</sup> _Gr.2 <sup>2</sup>	6 h <sup>1</sup> _Gr.3 <sup>3</sup>
Zellzahl <sup>4</sup>	327,38 $\pm$ 11,79	318,88 $\pm$ 8,69	214,74 $\pm$ 14,46	209,43 $\pm$ 2,63



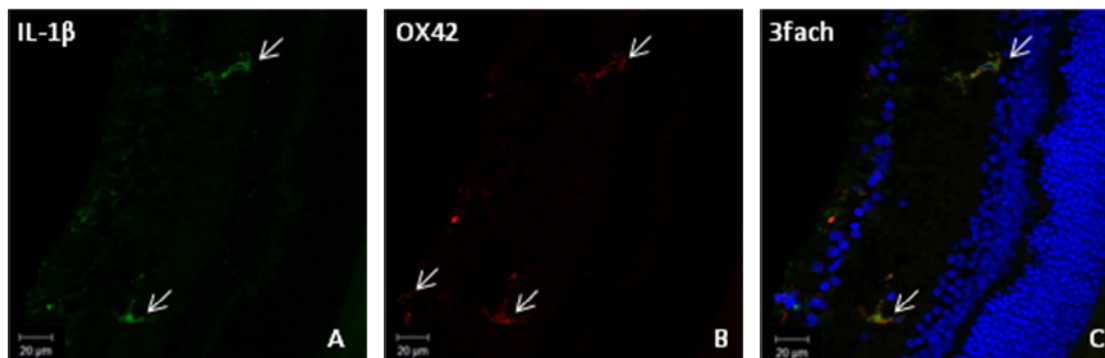
**Abbildung 20:** Anzahl OX42-positiver Zellen mit und ohne Statininjektion zu frühen postischämischen Zeitpunkten. Sowohl 3 h als auch 6 h nach TRI ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Zellzahl zwischen den Gruppen mit und ohne Simvastatininjektion. (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test)

#### 5.3.4 IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen nach Statingabe sind OX42-positiv

Um bei steigender Anzahl IL-1 $\beta$ -positiver Zellen und gleichbleibender Zahl OX42-markierter Zellen nach TRI und Simvastatininjektion eine mögliche Beteiligung anderer Zelltypen an der IL-1 $\beta$ -Produktion nach Statingabe zu untersuchen,



wurden Doppelfärbungen für IL-1 $\beta$  und OX42 sowie IL-1 $\beta$  und *GFAP* durchgeführt. IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen waren OX42-positiv (Abb. 21). Nicht alle OX42-positiven Zellen exprimierten auch IL-1 $\beta$ . Eine Kolo-kalisation mit *GFAP* konnte nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 21:** 3fach-Färbung IL-1 $\beta$ , OX42 und DAPI zur Identifizierung der IL-1 $\beta$ -exprimierenden Zellen nach TRI und Statingabe. (A) IL-1 $\beta$ -markierte Zellen in der inneren Retina. (B) OX42-positive Zellen. (C) IL-1 $\beta$ , OX-42 und DAPI. IL1 $\beta$ -exprimierende Zellen sind OX42-positiv (Pfeile). Nicht alle OX42-positiven Zellen exprimieren IL1 $\beta$ .

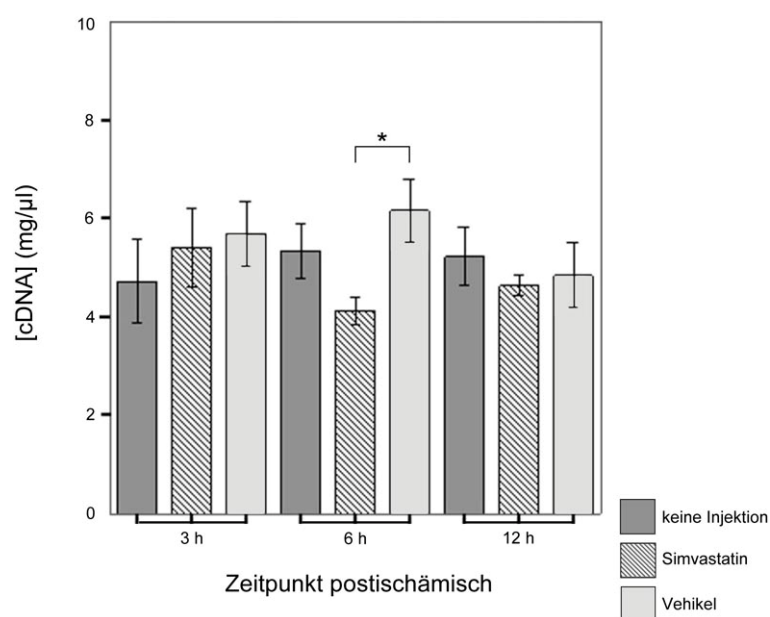
### 5.3.5 Postischämische Injektion von Simvastatin oder Vehikel führt nicht zu signifikanten Änderungen der TNF $\alpha$ -mRNA-Konzentration

Es wurde der Einfluss der postischämischen Injektion von Simvastatin oder Vehikel auf die TNF $\alpha$ -mRNA-Spiegel nach TRI untersucht. Wenngleich sich bei initial niedrigen Mengen an TNF $\alpha$ -cDNA und kleiner Gruppengröße keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen 2 bis 4 nachweisen ließen, waren tendenzielle Veränderungen erkennbar (Tab. 11, Abb. 22). Drei Stunden postischämisch führte sowohl die Injektion von Statin als auch von Vehikel zu einem leichten Anstieg der TNF $\alpha$ -cDNA-Konzentration. 6 h nach TRI kam es durch Gabe von Simvastatin zu einem Abfall der Menge an TNF $\alpha$ -cDNA. Die postischämische Injektion von Vehikel führte zum gleichen Zeitpunkt zu einer Zunahme des TNF $\alpha$ -cDNA-Spiegels. Gruppe 3 und 4 zum Zeitpunkt 6 h postischämisch unterschieden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ). 12 h nach

Beendigung der Ischämie zeigte sich eine leichte Abnahme der Menge an *TNFα-cDNA* nach Statininjektion verglichen mit Gruppe 2.

**Tabelle 11:** Semiquantitative Bestimmung [*TNFα-cDNA*] in (ng/μl). <sup>1</sup> MW ± SEM,  
<sup>2</sup> Zeitpunkt postischämisch

	keine Injektion <sup>1</sup>	Simvastatin <sup>1</sup>	Vehikel <sup>1</sup>
3 h <sup>2</sup>	4,00 ± 0,86	5,40 ± 0,81	5,68 ± 0,66
6 h <sup>2</sup>	5,34 ± 0,55	4,12 ± 0,28	6,15 ± 0,64
12 h <sup>2</sup>	5,22 ± 0,60	4,63 ± 0,21	4,83 ± 0,67



**Abbildung 22:** Beeinflussung der *TNFα-cDNA*-Konzentration durch Simvastatin und Vehikel. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mit und ohne Statininjektion bzw. Vehikelgabe nachweisen. 3 Stunden postischämisch kam es nach Injektion von Statin zu einem leichten Anstieg, 6 h und 12 h nach TRI zu einem geringen Abfall der *TNFα-cDNA*-Spiegel.

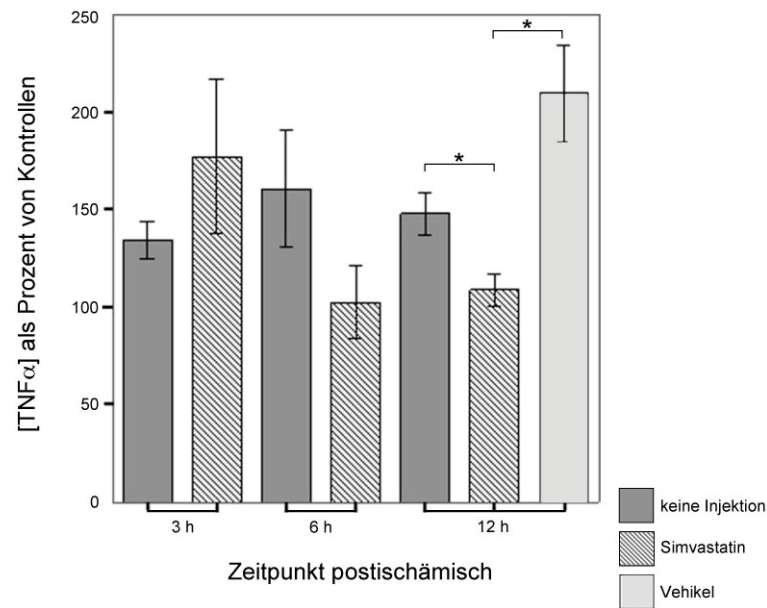
\* =  $p < 0,05$  (MW ± SEM; Mann-Whitney-U-Test)

### 5.3.6 Die Behandlung mit Simvastatin führt zu einer Abnahme der TNF $\alpha$ -Proteinexpression zum Zeitpunkt 12 h postischämisch

Nach der Analyse der TNF $\alpha$ -Genexpression nach TRI und Statinbehandlung, wurde untersucht, ob die auf mRNA-Niveau sichtbaren tendenziellen Veränderungen in der Zytokinmenge auch auf Proteinebene nachweisbar sind. Hierzu wurde ein ELISA (vgl. 4.11) durchgeführt und zunächst die TNF $\alpha$ -Proteinkonzentration der Gruppen 2 und 3 miteinander verglichen (Tab. 12, Abb. 23). Drei und 6 Stunden nach TRI und Simvastatininjektion ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den Gruppen ohne Statinbehandlung. Tendenzuelle Veränderungen zu diesen Zeitpunkten waren, wie auch schon auf mRNA-Niveau (vgl. 5.3.5), messbar, wobei es 3 h postischämisch zu einer geringen Steigerung und 6 h nach TRI zu einem leichten Rückgang der TNF $\alpha$ -Proteinmenge kam. Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass die TNF $\alpha$ -Proteinexpression nach Statingabe die Genexpression widerspiegelte. Zum Zeitpunkt 12 h postischämisch war eine signifikante Reduktion der Menge an TNF $\alpha$ -Protein in der Gruppe mit Statininjektion verglichen mit den Tieren der Gruppe 2 sichtbar ( $p < 0,05$ ). Zur Klärung der Frage, ob es sich hierbei um einen direkten Wirkmechanismus von Simvastatin oder um einen Injektionseffekt handelte, wurde die TNF $\alpha$ -Proteinkonzentration der Gruppe 4 zum Zeitpunkt 12 h postischämisch bestimmt. Die Gabe des Vehikels verringerte die Menge an TNF $\alpha$  nicht, sondern bewirkte eine leichte Steigerung der TNF $\alpha$ -Proteinkonzentration. Gruppe 3 und 4 unterschieden sich zu diesem Zeitpunkt signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ).

**Tabelle 12:** Bestimmung [TNF $\alpha$ -Protein] als Prozent von Kontrollen. <sup>1</sup> MW  $\pm$  SEM, <sup>2</sup> Zeitpunkt postischämisch, <sup>3</sup> nicht bestimmt

	keine Injektion <sup>1</sup>	Simvastatin <sup>1</sup>	Vehikel <sup>1</sup>
3 h <sup>2</sup>	134,49 $\pm$ 9,54	177,10 $\pm$ 44,11	n.b. <sup>3</sup>
6 h <sup>2</sup>	160,64 $\pm$ 30,22	102,43 $\pm$ 18,51	n.b. <sup>3</sup>
12 h <sup>2</sup>	147,85 $\pm$ 8,35	108,69 $\pm$ 8,35	209,46 $\pm$ 24,66



**Abbildung 23:** Beeinflussung der retinalen  $TNF\alpha$ -Proteinkonzentration durch Simvastatin und Vehikel. Drei Stunden postischämisch kam es zu einer geringen Steigerung und 6 h nach TRI zu einem leichten Rückgang der  $TNF\alpha$ -Proteinmenge nach Simvastatininjektion. 12 h postischämisch war nach Statin-Behandlung, aber nicht nach Vehikelgabe eine signifikante Reduktion der Menge an  $TNF\alpha$ -Protein sichtbar. \* =  $p < 0,05$  (MW  $\pm$  SEM; Mann-Whitney-U-Test)

## 6. DISKUSSION

### 6.1 Diskussion der Methoden

#### **Versuchstiere**

Auf der Suche nach klinisch relevanten Tiermodellen wurden Studien zur retinalen Minderperfusion an zahlreichen Spezies, unter anderem Primaten (Hayreh und Weingeist 1980) und Kleinnagern (Buchi et al. 1991, Hughes 1991, Adachi et al. 1996), durchgeführt. Unterschiedliche arterielle Versorgungsmuster limitieren hierbei die Vergleichbarkeit zwischen den Arten und die Transponierbarkeit auf die menschliche Netzhaut. Obgleich höhere Primaten die größte Ähnlichkeit zum Menschen aufweisen, verbietet sich deren umfassende Verwendung aus ethischen, praktischen und ökonomischen Gründen (Osborne et al. 2004). Unter Beachtung dieser Aspekte wurden zunehmend Ratten für die Erforschung von Netzhautischämien eingesetzt, wobei von einer primaten-ähnlichen, jedoch nicht identischen retinalen Blutversorgung ausgegangen werden muss (Sugiyama et al. 1999). Neben anatomischen Abweichungen begrenzen auch funktionelle Unterschiede die Übertragbarkeit zwischen den Spezies. Während bei der Ratte die äußere Retina als ischämieresistenter gilt, weisen bei Primaten die inneren Retinaschichten eine höhere Ischämietoleranz auf (Hughes 1991). Wie Safa und Osborne zeigen konnten, beeinflusst ferner der retinale Pigmentationsgrad das Ausmaß ischämischer Schädigung, wobei Albinoratten empfindlicher auf druckinduzierte Ischämie reagieren als pigmentierte Tiere (Safa und Osborne 2000).

#### **Induktion der transienten retinalen Ischämie mit der HIOP-Methode**

Die *HIOP*-Methode zur Erzeugung einer transienten retinalen Ischämie ist bei allen oben genannten Spezies etabliert und wurde in der, in dieser Arbeit angewendeten Form, erstmalig 1991 von Büchi und Mitarbeitern am Rattenauge beschrieben (Buchi et al. 1991). In den darauffolgenden Jahren wurde sie von verschiedenen Gruppen übernommen (Adachi et al. 1996, Zhou et al. 2000) und gewann zuletzt als ein gut reproduzierbares Läsionsmodell in der eigenen

Arbeitsgruppe an Bedeutung (Schmeer et al. 2008). Neben der technisch unproblematischen Durchführung und guten Wiederholbarkeit gelten die variabel festlegbare Ischämiedauer, die Reversibilität der Ischämie und eine mögliche Verwendung des kontralateralen Auges als intraindividuelle Kontrolle als Vorteile gegenüber anderen Ischämiemodellen. Als nachteilig müssen nicht-ischämiespezifische Veränderungen durch Druckschäden der Retina und des optischen Nervs (Hughes 1991), die Entstehung okulärer Entzündungen durch Punktion der vorderen Kammer (Adachi et al. 1996) und die begrenzte klinische Übertragbarkeit gewertet werden. *HIOP* führt zu einer Unterbrechung der retinalen und choroidalen Blutzufuhr und resultiert in einer kompletten Retinaischämie. Dies stellt einen bedeutenden Unterschied zum Zentralarterienverschluss des Menschen dar, bei dem es zu einer Ischämie der inneren Retina bei unbeeinträchtigter Perfusion der äußeren Netzhautschichten kommt. Als alternatives Läsionsmodell kann die Ligatur des *Nervus opticus* bei gleichzeitigem Verschluss der den Sehnerven angelagerten Gefäße (*A. centralis retinae* und *Aa. ciliares posteriores*, (Stefansson et al. 1988) aufgefasst werden (vgl. Tab. 1). Neben der druckinduzierten retinalen Ischämie muss der Augeninnendruckerhöhung selbst klinische Relevanz beigemessen werden. Wenngleich zahlreiche Tiermodelle zur Untersuchung glaukomatöser Schädigungsmechanismen existieren (vgl. Tab. 1), so basieren diese mit Ausnahme der *HIOP* auf einer chronischen Erhöhung des Augeninnendruckes, vergleichbar dem Bild des Offenwinkelglaukoms. Einzig das verwendete Modell des plötzlichen starken Augeninnendruckanstiegs spiegelt den Pathomechanismus des akuten Winkelblockglaukoms wider (Osborne et al. 2004). Neben der, wenn auch begrenzten klinischen Relevanz kann *HIOP* als eines der grundlegenden *in vivo* Modelle zur Untersuchung zellulärer Reaktionen neuronalen Gewebes auf ischämische Zustände verstanden werden.

Die Verwendung von Chloralhydrat zur Narkoseeinleitung erfolgte in Anlehnung an frühere Arbeiten (Buchi et al. 1991, Adachi et al. 1996). Wir verzichteten hierbei bewusst auf den Einsatz von Barbituraten, welche aufgrund ihrer kardiodepressiven Wirkung eine okuläre Minderperfusion verstärkt hätten (Hughes 1991). Von der Anwendung alternativer nicht kardiodepressiver Anästhetika wie Ketamin und Fentanyl wurde aufgrund möglicher antiexzitotoxischer und neuroprotektiver Effekte abgesehen (Olney et al. 1986, Ozden und Isenmann

2004). Zum Ausschluss anästhesiebedingter Gruppenunterschiede erhielten alle Tiere inklusive der Kontrolltiere (Gruppe 1) eine Chloralhydratinjektion.

Prä- und postoperativ wurden Ofloxacin-Augentropfen zur Infektionsprophylaxe eingesetzt. Die Durchführung einer perioperativen Antibiotikaprophylaxe erfolgte in Anlehnung an Zhou und Mitarbeiter (Zhou et al. 2000). Anstelle des dort verwendeten Gentamicins fand in der vorliegenden Arbeit das Breitspektrumantibiotikum Ofloxacin Anwendung. Sein Wirkspektrum umfasst wesentliche Keime von Oberflächeninfektionen des äußeren Auges inklusive Pathogenen, die eine Resistenz gegenüber Gentamicin aufweisen (ODDB 2000). Ofloxacin wirkt durch Hemmung der Bakterien-DNS-Gyrase bakterizid und sollte einer erregerassoziierten und damit nicht ischämiebedingten Entzündungsreaktion entgegen wirken. Tierexperimentell konnte eine Anreicherung von lokal appliziertem Ofloxacin in Hornhaut, Bindehaut, Sklera, Iris, Ziliarkörper und vorderer Augenkammer nachgewiesen werden. Daten zur systemischen Resorption nach lokaler Applikation liegen bislang nicht vor (AMZV 2006).

Die Beurteilung des Augeninnendruckes während *HIOP* erfolgte visuell und apparativ. Sichtbare Zeichen der okulären Minderperfusion, wie das Abbleichen der vorderen Augenabschnitte mit Beginn der Druckerhöhung, ließen sich durch Augeninnendruckmessung mittels Rebound-Tonometer verifizieren. Diese Methode wurde von Kontiola und Mitarbeitern am Rattenauge validiert (Kontiola et al. 2001) und wird in der eigenen Arbeitsgruppe regulär angewendet (Schmeer et al. 2008).

Die *HIOP*-induzierte Minderperfusion wurde 75 Minuten lang aufrecht erhalten und durch Entfernen der Nadel aus der vorderen Augenkammer abrupt beendet. Diese Ischämiedauer ergab sich unter Beachtung von bekannten Studien anderer Arbeitsgruppen. So konnten Safa und Osborne anhand von elektrophysiologischen Untersuchungen zeigen, dass eine 35-minütige Ischämie zu irreversiblen funktionellen Veränderungen bei der Albinoratte führt (Safa und Osborne 2000). Takahashi und Mitarbeiter beschrieben anhaltende morphologische Retinaveränderungen, wie die Degeneration innerer Retinaschichten und die Abnahme der Ganglienzellzahl, nach 45 Minuten andauernder *HIOP* (Takahashi et al. 1992). Andere Studien postulieren reproduzierbare histologische Veränderungen nach 60-minütiger TRI (Hughes 1991). In Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe fand sich 10 Tage nach 75-

minütiger *HIOP* eine Abnahme der retinalen Ganglienzellzahl um 64 Prozent, so dass hierbei von einer hinreichenden Ischämiedauer zur Erzeugung reproduzierbarer Veränderungen ausgegangen werden kann (Schmeer et al. 2008).

### **Simvastatin-Behandlung**

Im zweiten Teil der Studie wurde den Tieren der Gruppe 3 einmalig Simvastatin (8 mg pro kg KG) subkutan eine Stunde postischämisch injiziert. In vorangegangenen Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe war der Einfluss der Substanzen Mevastatin, Pravastatin, Lovastatin und Simvastatin auf das Ganglienzellüberleben nach TRI untersucht wurden. Hierbei ließ sich für Pravastatin und Simvastatin das günstigste Wirkprofil nachweisen (Schmeer et al. 2008), so dass die Versuche in der vorliegenden Arbeit mit Simvastatin fortgeführt wurden. Wenngleich in der klinischen Anwendung beim Menschen Dosierungen bis 1 mg/kg/d Anwendung finden, weisen die in Tierversuchen applizierten Mengen eine große Spannbreite auf und reichen von 0,2 bis 20 mg/kg/d (Schmeer et al. 2008). Da in Voruntersuchungen Dosierungen kleiner als 4 mg/kg/d keine signifikante Wirkung auf das Ganglienzellüberleben zeigten (Schmeer et al. 2008), wurde in der vorliegenden Arbeit eine Statinkonzentration von 8 mg/kg/d gewählt. Mit Blick auf die klinische Relevanz entschieden wir uns für die einmalige postischämische Injektion. Eine Vorbehandlung oder eine Behandlung mit Statinen über einen längeren Zeitraum fand somit nicht statt. Die Injektion erfolgte subkutan, da sich die intraperitoneale Gabe in vorangegangenen Versuchen als unwirksam erwiesen hatte (Schmeer et al. 2008). Zur Untersuchung des alleinigen Injektionseffekts sowie einer möglichen Wirkung der zur Lösung des Statins verwendeten Substanzen wurde den Tieren der Gruppe 4 eine Stunde postischämisch einmalig ein Vehikel injiziert.

Vorangegangene Untersuchungen postulieren substanz- und konzentrationspezifische Wirkungen dieser Medikamente. So ist Simvastatin als lipophiler Vertreter der Gruppe in der Lage Membranen durch passive Diffusion zu überwinden, während für die Aufnahme hydrophiler Substanzen, wie Pravastatin spezifische Transporter benötigt werden (Mason 2006). Des Weiteren beeinflusst Simvastatin dosisabhängig die basale Sekretion von IL-6 durch Mikrogliazellen *in*



*vitro*. Wie Lindberg und Mitarbeiter zeigen konnten, führen niedrige Mengen von Simvastatin zu einem Anstieg der basalen IL-6-Sekretion, während hohe Dosen eine Reduktion der IL-6-Spiegel zur Folge haben (Lindberg et al. 2005).

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### OX42-positive Zellen sind Bestandteil der nicht-ischämischen Retina

Mikrogliazellen kommen in allen Bereichen des zentralen Nervensystems inklusive dem optischen Nerv und der Netzhaut vor (Farber und Kettenmann 2005). Ihre Vorläuferzellen treten während der späten Embryonal- und frühen Postnatalperiode über die noch unreifen Blutgefäße in die Retina ein und sind in der sich entwickelnden Netzhaut überwiegend in der *INL*, *IPL* und *GCL* lokalisiert (Langmann 2007, Chen et al. 2002). Als eine Hauptaufgabe dieser Zellen muss die Phagozytose und Elimination von Zelltrümmern degenerierender Neurone der *IPL* und *GCL* gewertet werden (Langmann 2007). Nach Abschluss der ZNS-Entwicklung wandeln sich die zuvor amöboiden phagozytierenden Mikrogliazellen in ruhende dendritische Zellen des reifen ZNS (Barron 1995, Davis et al. 1994).

In der Retina adulter Ratten sahen wir einzelne OX42-positive Zellen in den inneren Retinaschichten (*INL*, *IPL*, *GCL*) mit überwiegender Lokalisation in der *IPL* (vgl. 5.1.1). Diese Zellen bestanden aus einem ovalen Zellkern sowie feinen, verzweigten Fortsätzen und wurden im Weiteren als dendritische Zellen bezeichnet. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit Untersuchungen von Zhang und Mitarbeitern, welche zusätzlich zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper OX42 die Primärantikörper *anti-5D4* und *anti-ED1* verwendeten (Zhang et al. 2005a). Gilt OX42 als etablierter Marker zum Nachweis von Mikrogliazellen/Makrophagen unabhängig von ihrem Aktivierungszustand, so markiert *anti-5D4* ein Keratansulfatepitop, welches eine hochdifferenzierte Subpopulation mikroglialer Zellen charakterisiert und *anti-ED1* bindet das von Monozyten und Makrophagen exprimierte Antigen ED1 (Zhang et al. 2005a). Entsprechend müssen bei der Interpretation der Ergebnisse die Grenzen der immunphänotypischen Charakterisierung von Mikrogliazellen berücksichtigt werden. Da zahlreiche Antigene von mehreren Zellreihen exprimiert werden, gilt die klare Abgrenzung der Mikrogliazelle gegenüber Monozyten/Makrophagen

sowie die Unterscheidung von Neutrophilen Granulozyten in definierten Pathologien als schwierig (Barron 1995, Matsumoto et al. 2007). Wie Zhang und Mitarbeiter zeigen konnten, bilden Mikrogliazellen überdies eine heterogene Gruppe, deren Charaktisierung mit Hilfe eines Antikörpers nur mäßig gelingt. Durch Doppelfärbungen mit den oben genannten Antikörpern ließen sich in der nicht-ischämischen Retina drei Subpopulationen mikroglialer Zellen unterscheiden (OX42+ 5D4+, OX42+ 5D4-, OX42- 5D4+), wobei ein Großteil dieser Zellen, jedoch nicht alle, durch OX42 identifiziert werden konnten (Zhang et al. 2005a).

Die Bedeutung der Mikrogliazellen unter physiologischen Bedingungen bleibt Gegenstand aktueller Forschung. Wie mittels *in vivo* Untersuchungen gezeigt werden konnte, verharren die Zellen im gesunden Gewebe nicht im Ruhezustand, sondern überwachen mit Hilfe der hoch dynamischen Fortsätze fortwährend ihre Umgebung (Nimmerjahn et al. 2005). Dieses Verhalten ermöglicht es der Mikrogliazelle „Abfallprodukte“ und Gewebetrümmer zu beseitigen (Nimmerjahn et al. 2005). Zahlreiche Oberflächenmoleküle, wie Wachstumsfaktor-, Zytokin-, Chemokin- und Komplementrezeptoren, konnten identifiziert werden und befähigen die Zellen fortwährend mit ihrer Umgebung in Kontakt zu treten (Langmann 2007). Weitere Ergebnisse legen nahe, dass Mikrogliazellen in der Lage sind durch Rezeptoren der klassischen Neurotransmitter Glutamat und GABA ferner neuronale Aktivität wahrzunehmen (Farber und Kettenmann 2005). Lange Zeit bereits galten Mikrogliazellen als die immunkompetenten Zellen des ZNS (Streit 2002). Neben oben genannten Zytokin- und Chemokinrezeptoren exprimieren sie phänotypische Marker antigenpräsentierender Zellen, wie *MHC*-Moleküle und kostimulatorische Signale und besitzen die Fähigkeit zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen (Streit 2002, Matsubara et al. 1999, Langmann 2007).

Die Beobachtung, dass ruhende Mikrogliazellen kaum phagozytische Aktivität zeigen und nur geringe Mengen kostimulatorischer Moleküle exprimieren, hat zur Untersuchung von Kontrollmechanismen geführt, welche das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung in der gesunden Retina begrenzen (Dick et al. 2003). Besondere Bedeutung kommt hierbei der Synthese von *TGF-β* durch das retinale Pigmentepithel und seiner antiinflammatorischen Wirkung sowie der Expression des *CD200* Rezeptors auf monozytären Zellen zu (Langmann 2007). Dessen Interaktion mit seinem physiologischerweise auf Neuronen, Endothelzellen,

Lymphozyten und dendritischen Zellen vorkommenden Liganden limitiert die Mikrogliaaktivierung in der nicht-ischämischen Retina (Langmann 2007).

### **Transiente retinale Ischämie führt zur Mikrogliazellaktivierung**

Mikrogliaaktivierung, wie sie bei zahlreichen Schädigungen des ZNS auftritt, ist durch charakteristische Abläufe geprägt, zu denen neben der Zunahme der Zellzahl, Änderungen der Zellmorphologie und Größe, Modifikationen der Genexpression, *de novo*-Expression von Oberflächenmolekülen und Freisetzung zahlreicher Mediatoren gehören (Langmann 2007, Streit et al. 1999).

Wir sahen einen Anstieg der Zahl OX42-positiver Zellen in der inneren Retina nach TRI mit einem frühen Maximum 3 Stunden postischämisch (vgl. 5.1.2). Die Zellzahl blieb im gesamten Verlauf signifikant gegenüber Kontrollen erhöht. Eine von Zhang und Mitarbeitern durchgeführte semiquantitative Untersuchung OX42-positiver Zellen nach 60-minütiger TRI bestätigte die erhöhte Zahl OX42-positiver Mikrogliazellen 24 h nach TRI, welche bis zu 2 Wochen nach retinaler Ischämie anhielt (Zhang et al. 2005a). Die Anzahl der Zellen 3 Stunden postischämisch war jedoch nicht Gegenstand dieser Studie, wodurch das oben genannte frühe Maximum nicht erfasst wurde. Zusammenfassend muss von einer 3 Stunden postischämisch, oder noch zeitiger beginnenden, ein frühes Maximum durchlaufenden und bis zu 2 Wochen persistierenden Zunahme OX42-positiver Zellen nach TRI ausgegangen werden. Eine Zunahme der Zahl an Mikrogliazellen fand sich ferner in anderen retinalen Läsionsmodellen, wie der Axotomie des optischen Nerven, der ischämieinduzierten Retinopathie und der lichtinduzierten Photorezeptordegeneration, so dass von einer Aktivierung dieser Zellen durch unterschiedliche Schädigungsmechanismen ausgegangen werden muss (Zhang und Tso 2003, Zhang et al. 2005b, Davies et al. 2006, Thanos 1991).

Der Ursprung der, nach einer Schädigung auftretenden, Zellen ist noch nicht hinreichend geklärt. Immunphänotypische Gemeinsamkeiten der Mikrogliazelle mit Makrophagen legen das Vorhandensein einer gemeinsamen Vorläuferzelle und den Zellersatz durch Einwanderung monozytärer Zellen mit Ursprung im Knochenmark nahe. Wie Albin und Mitarbeiter unter Verwendung von Knochenmarkchimären zeigen konnten, muss unter physiologischen Bedingungen (nicht-ischämische Retina) jedoch von einer relativen Stabilität der

Mikrogliapopulation ausgegangen und Zellersatz durch Einwanderung von Zellen aus dem Knochenmark über die intakte Blut-Retina-Schranke als nachrangig angesehen werden (Albini et al. 2005). Gestützt wird diese Annahme durch neuere Untersuchungen von Kaneko und Mitarbeitern. Diese fanden in nicht-läsionierten Mäuseaugen Zellen mit Ursprung im Knochenmark in großer Zahl im Ziliarkörper, in der Aderhaut und um den optischen Nerv, während innerhalb der Netzhaut nur einzelne dieser Zellen lokalisiert werden konnten (Kaneko et al. 2008). Infolge retinaler Schädigung zeigte sich allerdings eine Zunahme oben genannter Zellen im Bereich retinaler Gefäße, des Ziliarkörpers und des optischen Nervis, welche sich im Folgenden über die gesamte Retina ausbreiteten (Kaneko et al. 2008). Dabei wies ein Großteil dieser Zellen morphologische und immunhistochemische Merkmale von Mikrogliazellen auf (Kaneko et al. 2008). Trotz der untergeordneten Bedeutung des Knochenmarks für den Zellersatz unter physiologischen Bedingungen muss von einer Rekrutierung peripherer Zellen mit Ursprung im Knochenmark sowie deren Differenzierung zu Mikrogliazellen nach retinaler Schädigung ausgegangen werden. Demgegenüber steht die postulierte Fähigkeit der Mikrogliazelle zur Proliferation (Davis et al. 1994). Wesentliche Voraussetzung wäre eine mitotische Aktivität der Zellen, welche für zerebrale Mikrogliazellen *in vitro* nachgewiesen werden konnte (Glenn et al. 1992). Aktuelle Untersuchungen belegen, dass auch retinale Mikrogliazellen infolge einer Schädigung des optischen Nervis zur Proliferation fähig sind (Wohl et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit beobachteten wir als Reaktion auf die retinale Ischämie stereotype morphologische Veränderungen OX42-positiver Mikrogliazellen. Verglichen mit dem dendritischen Zelltyp der nicht-ischämischen Retina zeigten sich 3 Stunden nach *HIOP* vielgestaltige Mikrogliazellen/Makrophagen, welche durch unterschiedlich große, teils hypertrophe Zellkerne und eine beginnende Retraktion der Fortsätze gekennzeichnet waren (vgl. 5.1.3). Ein ähnliches Bild bot sich 6 h postischämisch. Diese Ergebnisse sind kongruent mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, welche entsprechende Veränderungen OX42-positiver Zellen 6 h nach 60-minütiger TRI sahen und diese Zellen als amöboid bezeichneten (Zhang et al. 2005a). Laut Streit und Mitarbeitern stellen sowohl die mikrogliale Hypertrophie als auch die Änderung im Verzweigungsmuster wiederkehrende morphologische Zeichen der Zellaktivierung dar (Streit et al. 1999). In der vorliegenden Studie dominierten 12 h nach Beendigung der Ischämie

runde, hypertrophe Zellen mit einzelnen kurzen Fortsätzen das Bild, welche auch 24 h postischämisch nachweisbar waren. Diese ähneln morphologisch phagozytierenden Mikrogliazellen im Gehirn und könnten an der Phagozytose degenerierender Zellen nach TRI beteiligt sein (Streit et al. 1999, Zhang et al. 2005a). Zhang und Mitarbeiter beschrieben eine Rückkehr der Mikrogliazellen zur amöboiden Form ab dem 3. und eine Zunahme des Anteils dendritischer (ruhender) OX42-positiver Zellen zwischen dem 7. und 14. Tag nach retinaler Ischämie (Zhang et al. 2005a). Demzufolge muss reaktiven Mikrogliazellen die Fähigkeit zugesprochen werden, sich nach der Erholung des geschädigten Gewebes wieder in ihre ruhende Form umzuwandeln (Streit et al. 1999).

### **Bedeutung der Mikrogliazellaktivierung**

In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff „aktiviert“ für Mikrogliazellen verwendet, welche nach neuronaler Schädigung eine charakteristische Morphologie aufweisen. Abzugrenzen hiervon ist die Bezeichnung „aktivierte Mikroglia“ *in vitro*, welche Zellen beschreibt, die z.B. durch Lipopolysaccharid stimuliert wurden (Streit et al. 1999). Von Bedeutung ist diese Unterscheidung, da stimulierte Mikrogliazellen *in vitro* ein um ein Vielfaches höheres Aktivierungsniveau aufweisen als aktivierte Zellen *in vivo*, was die Vergleichbarkeit zwischen diesen Modellen minimiert (Streit et al. 1999).

In zahlreichen Untersuchungen konnte eine Beteiligung der Mikrogliazellen sowohl an neuroprotektiven als auch an neurodegenerativen Vorgängen nachgewiesen werden (Gonzalez-Scarano und Baltuch 1999, Streit 2002, Chen et al. 2002, Streit et al. 1999). Als wesentliche günstige Eigenschaften müssen in diesem Zusammenhang die Förderung neuronaler Regeneration nach Axotomie sowie die Produktion von Neurotrophinen und Wachstumsfaktoren angesehen werden (Streit 2002, Streit et al. 1999). Formen schädlicher Reaktionen sind die Freisetzung potentiell neurotoxischer Substanzen wie proinflammatorischer Zytokine, Arachidonsäure, Nitritoxid und reaktiver Sauerstoffspezies (Gonzalez-Scarano und Baltuch 1999). Eine Beteiligung der Mikrogliazelle an chronisch entzündlichen ZNS-Erkrankungen (*Multiple Sklerose*) gilt als sicher, auch für chronisch degenerative Erkrankungen, wie *Morbus Alzheimer* wird sie angenommen (Gonzalez-Scarano und Baltuch 1999). Grundsätzlich scheint es notwendig,

hierbei zwischen akuter Schädigung und chronischen Erkrankungen zu unterscheiden. Während es im Rahmen der akuten Läsion zu einer kurzfristigen Mikrogliaaktivierung und Produktion proinflammatorischer Zytokine kommt, sind chronische Veränderungen durch eine anhaltende Zellaktivierung und langfristig erhöhte Zytokinspiegel gekennzeichnet (Streit et al. 1999). Ersteres könnte in der Akutsituation die Neuroregeneration fördern, während chronische Aktivierungen Neurodegeneration noch verstärken würden (Streit et al. 1999).

### **TRI führt zur gesteigerten Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ und TNF $\alpha$ zu frühen postischämischen Zeitpunkten**

In der vorliegenden Arbeit wurde besonderes Augenmerk auf die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  gelegt, da diese als die klassischen proinflammatorischen Zytokine gelten und vorangegangene Untersuchungen eine wesentliche Beteiligung dieser Substanzen an der Pathogenese der zerebralen und retinalen Ischämie nahe legen (Yoneda et al. 2001, Touzani et al. 1999, Wang und Shuaib 2002, Berger et al. 2008, Hangai et al. 1996).

IL-1 kommt in den beiden Isoformen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vor, welche als Vorläufermoleküle synthetisiert werden (Dinarello 1996). Ihre Spaltung erfolgt durch das IL-1 *converting enzyme* (ICE, *Caspase 1*) in die reife Form. Während IL-1 $\alpha$  hauptsächlich membrangebunden existiert, wird IL-1 $\beta$  sezerniert (Wang und Shuaib 2002). Letzteres vermittelt seine Wirkung durch die Bindung an den IL-1-Rezeptor-I, der für seine Aktivierung akzessorische Moleküle (*Interleukin-1-receptor accessory protein*) benötigt und eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt, die unter anderem zur Freisetzung von Transkriptionsfaktoren wie *NF- $\kappa$ B* führt (Patel et al. 2003, Wang und Shuaib 2002). Neben dem oben genannten IL-1-Rezeptor-I existiert ein IL-1-Rezeptor-II, welcher die Liganden bindet, jedoch kein Signal transduziert (Dinarello 1996).

Im gesunden Gewebe finden sich nur geringe Mengen an IL-1 $\beta$ , wenngleich ein Anstieg der IL-1 $\beta$ -Spiegel im Rahmen zahlreicher ZNS-Pathologien beobachtet werden kann (Patel et al. 2003, Wang und Shuaib 2002). Obwohl sich die Läsionsmodelle hinsichtlich ihrer Schädigungsmechanismen unterscheiden, scheint IL-1 $\beta$  eine zentrale Bedeutung im Prozess des neuronalen Zelltods zuzukommen (Hanisch 2002). Wie frühere Arbeiten gezeigt haben, führt sowohl

fokale, durch Verschluss der *A. cerebri media* (*middle cerebral artery occlusion*, *MCAO*) induzierte, als auch globale zerebrale Ischämie (durch bilateralen Verschluss der *A. carotis*) zu einem Anstieg der *IL-1 $\beta$ -mRNA*-Level zu frühen postischämischen Zeitpunkten (Buttini et al. 1994, Sairanen et al. 1997). Auch wenn diverse Untersuchungen zur Expression von *IL-1 $\beta$*  nach retinaler Schädigung existieren, liegt zum aktuellen Zeitpunkt keine Studie zur Genexpression des Interleukins nach TRI vor.

Wir untersuchten deshalb die Menge an *IL1- $\beta$ -cDNA* bei Kontrolltieren und zu verschiedenen Zeitpunkten postischämisch (vgl. 5.2.1). Während sich in der nicht-ischämischen Retina geringe Mengen an *IL1- $\beta$*  nachweisen ließen, kam es nach TRI zu einem signifikanten Anstieg der *IL1- $\beta$ -cDNA*-Spiegel zu den Zeitpunkten 3 h, 6 h und 12 h postischämisch. Bereits 24 h nach TRI unterschied sich die Menge an *IL1- $\beta$ -cDNA* nicht mehr signifikant von den Ausgangswerten. Zusammenfassend muss von einer wesentlichen Beteiligung dieses Zytokins an der akuten postischämischen Entzündungsreaktion ausgegangen werden.

Entsprechende Veränderungen zeigten sich auch bei weiteren retinalen Läsionsmodellen wie der Ligatur des optischen Nervs. So fanden Hangai und Mitarbeiter eine signifikante Zunahme der *IL1- $\beta$ -Genexpression* in der frühen Reperfusionphase mit einem Maximum 12 h postischämisch und einem anschließenden Rückgang der *IL1- $\beta$ -cDNA*-Spiegel, was eine stereotype Antwort *IL1- $\beta$ -produzierender Zellen* in unterschiedlichen Ischämiemodellen nahe legt (Hangai et al. 1995).

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass Transkription ohne Translation möglich ist und somit nicht in jedem Fall von der Genexpression auf die Proteinsynthese geschlossen werden kann (Dinarello 1996). Als hilfreich hat sich hierbei die Durchführung von *ELISA* zur Quantifizierung des Proteinniveaus erwiesen, wobei in früheren Arbeiten zur TRI ein frühzeitiger postischämischer Anstieg von *IL1- $\beta$*  auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. So konnten Zhou und Mitarbeiter zeigen, dass bereits eine ultrakurze Ischämiedauer von einer Minute zu einer messbaren Steigerung der *IL1- $\beta$ -Expression* 6 h nach TRI führt (Zhou et al. 2000). Ein ähnlicher Zeitverlauf findet sich nach 45-minütiger TRI, wobei es ausgehend von geringen basalen *IL1- $\beta$ -Spiegeln* zu einem transienten Anstieg der

Interleukinexpression 3 h bis 12 h postischämisch kommt, gefolgt von einem Rückgang auf Ausgangswerte 48 h nach TRI (Yoneda et al. 2001).

Der Ursprung der IL-1 $\beta$ -Produktion bleibt im Einzelnen noch zu klären, wenngleich zahlreiche Zelltypen identifiziert werden konnten, die an der Synthese von Interleukinen im ZNS beteiligt zu sein scheinen. So ließ sich eine konstitutive IL-1 $\beta$ -Expression im nicht läsierten Gehirn für Neurone, Astroglia, Oligodendrozyten und Endothelzellen nachweisen (Touzani et al. 1999). Als zellulärer Ursprung der gesteigerten IL-1 $\beta$ -Proteinexpression nach fokaler und globaler zerebraler Ischämie konnten neben Astro- und Oligodendrozyten auch Mikrogliazellen und Makrophagen identifiziert werden (Davies et al. 1999, Sairanen et al. 1997). Da zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeit keine Untersuchungen zum zellulären Ursprung der IL-1 $\beta$ -Produktion nach *HIOP* vorlagen, sollten IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen zunächst mit Hilfe immunhistochemischer Verfahren lokalisiert und ihre Zelltypzugehörigkeit aufgeklärt werden.

Während sich in der nicht-ischämischen Retina keine IL-1 $\beta$ -positiven Zellen fanden, konnten 3 h, 6 h und 12 h nach TRI IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen in der inneren Retina identifiziert werden (vgl. 5.1.4). Die auftretenden zellulären Veränderungen spiegeln somit die unter 5.2.1 beschriebenen *cDNA*-Spiegel nach *HIOP* wider und sind analog zu den von Yoneda und Mitarbeitern gefundenen Veränderungen des IL-1 $\beta$ -Proteinniveaus (Yoneda et al. 2001). Zur Untersuchung der Zelltypzugehörigkeit IL-1 $\beta$ -positiver Zellen wurden Färbungen mit dem Mikroglia-/Makrophagenmarker OX42 sowie dem astrozytären Marker *GFAP* durchgeführt. Hierbei zeigten sich IL-1 $\beta$ -positive Zellen OX42-positiv, wobei auffallend war, dass nicht alle OX42-markierten Zellen IL-1 $\beta$  exprimierten (vgl. 5.1.5). Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Mikrogliazellen-, Makrophagenpopulation postischämisch die Fähigkeit erhält IL-1 $\beta$  zu produzieren.

Abweichend von anderen retinalen Schädigungsmodellen wie dem der *Ablatio retinae* (*retinal detachment*, Nakazawa et al. 2006) ließ sich eine Kolokalisation von IL-1 $\beta$  und *GFAP* nach TRI nicht nachweisen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass Astrozyten nicht direkt zur IL-1 $\beta$ -Produktion im Rahmen druckinduzierter retinaler Ischämie beitragen. Außer Frage steht jedoch die wechselseitige Beeinflussung von Mikrogliazellen, Astrozyten und Zytokinen. So



gelten Mikrogliazellen sowohl als Quelle als auch als Effektoren zahlreicher Zytokine. Astrozyten fördern die mikrogliale Phagozytose und von Mikrogliazellen produzierte Substanzen wie zum Beispiel IL-1 sind beteiligt an der astrozytären Proliferation (Hanisch 2002).

Bislang konnten zahlreiche IL-1 $\beta$ -vermittelte Effekte aufgedeckt werden, die an der Pathogenese der ischämischen Retinaschädigung beteiligt zu sein scheinen. So induziert IL-1 $\beta$  die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 E-Selektin und L-Selektin und fördert hierdurch die Leukozyteninvasion in das ZNS (Dinarello 1996). Des Weiteren konnte eine erhöhte Produktion proinflammatorischer Mediatoren, wie NO und Prostaglandine, bedingt durch IL-1 $\beta$ -vermittelte Induktion der Genexpression von *iNOS*, *Cyclooxygenase-2* (COX-2) und *Phospholipase A<sub>2</sub>* beobachtet werden (Dinarello 1996). Konsequenterweise kam es nach experimenteller Reduktion der IL-1 $\beta$ -Aktivität zu einer Abnahme der neuronalen Schädigung. So weisen *IL-1-knockout*-Mäuse eine verminderte iNOS-Aktivität und eine signifikante Reduktion des neuronalen Zellschadens nach transients globaler Ischämie verglichen mit Wildtyp-Mäusen auf (Mizushima et al. 2002). Wie Yoneda und Mitarbeiter zeigen konnten, reduziert sowohl die intravitreale Injektion von einem IL-1-Rezeptorantagonist als auch die Gabe von Anti-IL-1-Antikörpern 5 Minuten vor TRI das Ausmaß ischämischer Schädigung nach TRI (Yoneda et al. 2001). Seine zentrale Rolle in der Pathogenese der ischämischen Retinaschädigung und die experimentelle Beeinflussbarkeit machen IL-1 $\beta$  zu einem wichtigen Angriffspunkt potentiell neuroprotektiver Strategien.

TNF $\alpha$  als zweiter Vertreter der proinflammatorischen Zytokine weist zahlreiche funktionelle Gemeinsamkeiten mit IL-1 $\beta$  auf. Er existiert in einer membrangebundenen (27 kD) und einer sezernierten (17 kD) Form, wobei Erstere durch das TNF $\alpha$  *converting enzyme* in die lösliche Form umgewandelt wird (Löffler und Petrides 2003). Beide Formen liegen bevorzugt als trimere Komplexe vor und binden den ebenfalls trimeren TNF-Rezeptor-I (p55) und/oder TNF-Rezeptor-II (p75) (Wang und Shuaib 2002). Neben der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden, ähnlich denen des IL-1-Rezeptors und der Freisetzung von NF- $\kappa$ B, ist der TNF-Rezeptor-I in der Lage Caspasen zu aktivieren und Apoptose zu induzieren (Löffler und Petrides 2003). Als weitere TNF-Rezeptor vermittelte Effekte gelten die Beeinflussung der Zellproliferation, -differenzierung und Zytokinproduktion (Hehlhans und Pfeffer 2005).

Diverse Untersuchungen zur Produktion von  $TNF\alpha$  nach zerebraler Schädigung zeigen Zeitverläufe, welche den oben beschriebenen postischämischen Veränderungen der  $IL-1\beta$ -Expression ähneln. So kommt es im Rahmen der fokalen zerebralen Ischämie (durch permanente MCAO) nach einer Stunde zum Anstieg der  $TNF\alpha$ -mRNA-Spiegel, gefolgt von einem Maximum nach 12 h und einer Persistenz erhöhter  $TNF\alpha$ -Level bis 5 Tage nach MCAO (Liu et al. 1994). Globale zerebrale Ischämie der Maus (durch bilateralen Verschluss der *A. carotis*) führt zu einem transienten Anstieg der  $TNF\alpha$ -Expression 1,5 h postischämisch, gefolgt von einem temporären Rückgang der Synthese und einem Wiederanstieg nach 3 Tagen (Uno et al. 1997). Wenngleich sich in der normalen Retina nur eine niedrige  $TNF\alpha$ -Genexpression findet, legen vorangegangene Arbeiten Änderungen der Expression dieses Zytokines auch im Rahmen der retinalen Ischämie nahe (Hangai et al. 1996, Zhou et al. 2000).

Wir untersuchten deshalb den Einfluss der TRI auf die postischämische  $TNF\alpha$ -Expression auf Gen- und Proteinniveau. Ausgehend von niedrigen Konzentrationen an  $TNF\alpha$ -cDNA bei Kontrolltieren kam es 3 h postischämisch zu einer signifikanten Induktion der Genexpression. Die  $TNF\alpha$ -cDNA-Level erreichten zwischen 6 h und 12 h postischämisch ein frühes Maximum und waren anschließend wieder rückläufig (vgl. 5.2.2). Nach Betrachtung aller Messwerte fiel auf, dass die  $TNF\alpha$ -cDNA-Spiegel nach TRI ähnliche Änderungen wie die des  $IL-1\beta$  zeigten. Jedoch unterschieden sich die beiden Zytokine hinsichtlich ihrer messbaren cDNA-Konzentration, wobei die von  $TNF\alpha$  deutlich unter der von  $IL-1\beta$  lag. Eine weitere Abweichung fand sich in der Persistenz erhöhter  $TNF\alpha$ -cDNA-Werte auch nach 24 h.

Diese Ergebnisse sind kongruent zu Untersuchungen der  $TNF\alpha$ -Genexpression nach Ligatur des optischen Nervs und der angelagerten Gefäße. Übereinstimmend zeigte sich hierbei ein früher Anstieg der Menge an  $TNF\alpha$ -cDNA mit einem Maximum 12 h postischämisch. Anschließend folgte ein Rückgang der cDNA-Konzentration bei Persistenz erhöhter Werte auch 24 h und 48 h nach der Läsion, verglichen mit Basalwerten (Hangai et al. 1996).

Nach der Analyse der  $TNF\alpha$ -Genexpression sollte untersucht werden, ob oben beschriebene Änderungen der Expressionskinetik auch auf Proteinniveau nachweisbar wären. Im durchgeführten ELISA zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Menge an  $TNF\alpha$ -Protein 3 h, 6 h und 12 h postischämisch bezogen

auf die Basalwerte. 24 h nach TRI blieben die TNF $\alpha$ -Spiegel tendenziell erhöht, unterschieden sich jedoch nicht mehr signifikant von den Werten der Kontrolltiere (vgl. 5.2.3). Zusammenfassend spiegelt die TNF $\alpha$ -Proteinexpression nach TRI die Genexpression wider. Demgegenüber steht eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Zunahme der TNF $\alpha$ -Proteinexpression nach 1- und 5-minütiger TRI (Zhou et al. 2000). Zhou und Mitarbeiter verwendeten hierbei eine ultrakurze Ischämiedauer und konnten in allen Proben nur eine geringe TNF $\alpha$ -Proteinkonzentration nachweisen, so dass die fehlende Signifikanz mutmaßlich als methodenabhängig und nicht als Ausdruck einer fehlenden Zytokinantwort zu werten ist. In anderen retinalen Läsionsmodellen wie dem der *Ablatio retinae* war hingegen ein signifikanter Anstieg sowohl der TNF $\alpha$ -mRNA-Spiegel als auch der TNF $\alpha$ -Proteinmenge 6 h nach der Schädigung nachweisbar (Nakazawa et al. 2006). Die von Berger und Mitarbeitern durchgeführte immunhistochemische Quantifizierung der TNF $\alpha$ -Expression nach 60-minütiger *HIOP* bestätigt die oben beschriebenen Veränderungen auf Gen- und Proteinniveau auch auf zellulärer Ebene. Hierbei ließ sich eine gesteigerte TNF $\alpha$ -Expression 3 h, 6 h, 12 h und 24 h postischämisch nachweisen (Berger et al. 2008).

Im nächsten Schritt sollte versucht werden, den zellulären Ursprung der TNF $\alpha$ -Produktion nach TRI zu identifizieren. Trotz intensiver Bemühungen gelang es nicht sicher und reproduzierbar TNF $\alpha$ -positive Zellen in der Retina zu detektieren. Ursachen hierfür könnten methodische Schwierigkeiten und die diffizile Nachweisbarkeit der geringen Menge an TNF $\alpha$  sein. In vorangegangenen Arbeiten zur zerebralen Ischämie war es gelungen, Mikrogliazellen/Makrophagen als zelluläre Quelle der TNF $\alpha$ -Expression zu identifizieren (Gregersen et al. 2000). Im Rahmen der globalen zerebralen Ischämie der Maus fand sich eine frühe TNF $\alpha$ -Produktion durch F4/80-positive Mikrogliazellen, gefolgt von einer verzögerten TNF $\alpha$ -Synthese durch Mikrogliazellen und Astrozyten 3 Tage postischämisch (Uno et al. 1997). *HIOP*-induzierte retinale Ischämie führte zur Steigerung der TNF $\alpha$ -Expression in den inneren Retinaschichten mit Bevorzugung der *GCL*, wobei in den vorliegenden Untersuchungen eine genaue Zelltypzuordnung nicht getroffen wurde (Fontaine et al. 2002, Berger et al. 2008). Außer Frage steht sicherlich die direkte und indirekte Beteiligung mehrerer Zellarten an der postischämischen TNF $\alpha$ -Produktion, wobei Mikrogliazellen und Makrophagen eine zentrale Rolle zugesprochen werden muss.

Die Effekte von TNF $\alpha$  sind vielfältig und nicht abschließend untersucht. TNF $\alpha$ -Wirkungen, die an der Pathogenese der retinalen Ischämie beteiligt sein könnten, werden im Folgenden angegeben. Zunächst beeinflusst das Zytokin vaskuläre Endothelzellen, fördert die Expression von endothelialen Oberflächenantigenen und die Invasion von Leukozyten in das geschädigte Gewebe (Hangai et al. 1996). Im Tierexperiment führt die kortikale Mikroinjektion von TNF $\alpha$  zu einer signifikanten Akkumulation von Neutrophilen in zerebralen Kapillaren und kleinen Blutgefäßen (Liu et al. 1994). Des Weiteren unterhält TNF $\alpha$  die inflammatorische Antwort durch Steigerung der Genexpression synergistisch wirkender Mediatoren wie IL-1, Induktion der iNOS und Förderung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Gregersen et al. 2000, Yoshida et al. 2004). Im Mausmodell der retinalen Neovaskularisation induziert TNF $\alpha$  die Synthese angiogenetischer Faktoren und muss somit als wesentlicher Bestandteil der Pathogenese der postischämischen Neovaskularisation angesehen werden (Yoshida et al. 2004). Untersuchungen zur Bedeutung des Tumornekrosefaktors nach MCAO legen dessen nachteiligen Einfluss auf das Ausmaß der zerebralen Ischämie nahe. So führt eine Blockade der endogenen TNF $\alpha$ -Wirkung durch monoklonale Antikörper oder löslichen TNF-Rezeptor-I zu einer Abnahme der Infarktgröße nach fokaler zerebraler Ischämie (Barone et al. 1997). Die intraventrikuläre Gabe von TNF $\alpha$  vor MCAO vergrößert postischämisch sowohl die Infarktgröße als auch das neurologische Defizit, während die Gabe neutralisierender TNF $\alpha$ -Antikörper vor exogener TNF $\alpha$ -Zufuhr dessen negative Wirkung wieder aufhebt (Barone et al. 1997). *In vitro*-Untersuchungen zur ischämischen und druckinduzierten Schädigung retinaler Ganglienzellen zeigten, dass eine Hemmung der TNF $\alpha$ -Aktivität durch neutralisierende Antikörper zur Reduktion der iNOS-Aktivität und zur Abnahme der Apoptose retinaler Ganglienzellen führt (Tezel und Wax 2000). *In vivo*-Untersuchungen zur retinalen Schädigung stimmen inhaltlich weitgehend mit denen zur zerebralen Ischämie überein. In Experimenten zur Bedeutung von TNF $\alpha$  nach TRI zeigte sich, dass die postischämische Gabe von rekombinantem TNF $\alpha$  das Ausmaß der ischämischen Schädigung noch erhöht, während die Gabe von neutralisierenden TNF $\alpha$ -Antikörpern zu einer funktionellen Verbesserung postischämisch führt, sichtbar am Erhalt der b-Welle im ERG nach 7 Tagen (Berger et al. 2008). Neurodegenerative Eigenschaften von TNF $\alpha$  postulieren auch Kitaoka und Mitarbeiter, die nachweisen konnten, dass es 2 Wochen nach

intravitrealer TNF $\alpha$ -Injektion zur Degeneration von Axonen im optischen Nerv kommt (Kitaoka et al. 2006).

Neben den genannten Arbeiten existieren Untersuchungen, welche gegensätzliche TNF $\alpha$ -Effekte postulieren. Ein Beispiel positiver TNF $\alpha$ -Wirkungen findet sich bei Diem und Mitarbeitern. Diese konnten zeigen, dass TNF $\alpha$  in der Lage ist das Ausmaß des sekundären Zelltodes retinaler Ganglienzellen nach Axotomie des optischen Nerven *in vivo* zu reduzieren (Diem et al. 2001). Andere Arbeiten fanden entgegengesetzte TNF $\alpha$ -vermittelter Effekte in Abhängigkeit vom gebundenen TNF-Rezeptortyp. So zeigten TNF-Rezeptor I *knockout*-Mäuse nach TRI ein geringeres Ausmaß der ischämischen Zellschädigung, während das Fehlen von TNF-Rezeptor II mit erhöhten retinalen Zelluntergang assoziiert war (Fontaine et al. 2002). Konsequenterweise muss von einer degenerationsfördernden Wirkung des TNF-Rezeptor I und einem protektiven Einfluss des TNF-Rezeptor II im Rahmen retinaler Ischämie ausgegangen werden (Fontaine et al. 2002).

Zusammengefasst scheint TNF $\alpha$  abhängig von der Art der Schädigung, der Höhe der resultierenden Zytokinkonzentration und der Rezeptoraktivierung sowohl für positive als auch schädliche Effekte nach zerebraler und retinaler Ischämie verantwortlich zu sein, wobei zum jetzigen Zeitpunkt das Wissen um seine negativen Auswirkungen überwiegt.

### **Modulation der akuten Entzündungsreaktion nach transieter retinaler Ischämie durch Simvastatin**

Die Gruppe der HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren, kurz Statine genannt, umfasst die natürlich vorkommenden Substanzen Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin und Mevastatin sowie die synthetisch hergestellten Statine Fluvastatin, Rosuvastatin, Atorvastatin und Pitavastatin (Weitz-Schmidt 2002). Die ihren neuroprotektiven Eigenschaften zu Grunde liegende Wirkungen und ihr therapeutisches Potenzial bei ophthalmologischen Erkrankungen wurden in Übersichtsartikeln ausführlich erörtert (Schmeer et al. 2006, Schmeer et al. 2007). Im Folgenden soll hier auf die immunmodulatorischen Eigenschaften der Statine als einen weiteren Teil ihrer pleiotropen Wirkungen eingegangen werden.

Nach einer neuronalen Läsion reduzieren Statine die Einwanderung inflammatorischer Zellen in das ZNS durch Hemmung der Leukozyten-Endothel- und Monozyten-Endothel-Interaktion (Honjo et al. 2002, Prasad et al. 2005). Besondere Bedeutung wird hierbei der verminderten Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 sowie der zellulären Adhäsionsmoleküle LFA-1 auf Lymphozyten und Mac-1 auf Monozyten zugesprochen (Weitz-Schmidt et al. 2001, Chung et al. 2002, Prasad et al. 2005, Greenwood et al. 2006). Die Statin-vermittelte Hemmung der Chemotaxis durch Abnahme der Chemokinrezeptorexpression auf B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen reduziert das Ausmaß der Einwanderung von Entzündungszellen weiter (Greenwood et al. 2006). Andere immunmodulatorische Effekte scheinen durch die Beeinflussung von T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen bedingt zu sein. So vermindern Statine die T-Zell-Proliferation *in vitro* und beeinflussen den T-Zell-Phänotyp (Weber et al. 2006). Wie Youssef und Mitarbeiter zeigen konnten, hemmt Atorvastatin die Th1-Differenzierung sowie die Freisetzung der Th1-Zytokine IL-2, Interferon  $\gamma$  und TNF $\alpha$  und fördert die Differenzierung der Th0- in Th2-Zellen (Youssef et al. 2002). Einen weiteren Wirkmechanismus stellt die Hemmung der Expression von *MHC-II*-Molekülen und kostimulatorischen Signalen (*CD40*, *CD80*, *CD86*) auf antigenpräsentierenden Zellen und die resultierende Verminderung der T-Zell-Aktivierung dar (Greenwood et al. 2006). Interessanterweise scheint die Beeinflussung der T-Zell-Proliferation und T-Zell-Differenzierung cholesterinunabhängig zu sein und in direkten Zusammenhang mit der statinvermittelten Abnahme isoprenoider Zwischenprodukte zu stehen (Dunn et al. 2006).

Mehrere der oben genannten Wirkmechanismen könnten auch Statin-vermittelten immunmodulatorischen Effekten nach retinaler Schädigung zu Grunde liegen. Ein wesentlicher Fokus vorangegangener Arbeiten lag hierbei auf der Erforschung der Leukozyten-Endothel-Interaktion als bedeutenden Teil der inflammatorischen Antwort. In Untersuchungen zur Gabe verschiedener Statine (Pravastatin, Cerivastatin und Pitavastatin) vor Ligatur des optischen Nerven ließ sich wiederholt eine postischämische Hemmung der Leukozyten-Endothel-Interaktion nachweisen (Honjo et al. 2002, Miyaki et al. 2009). Diese war durch eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen sowie eine Reduktion der Anzahl akkumulierender Leukozyten in retinalen Gefäßen und einer Abnahme des *rollings*,

als ersten Schritt der Leukozytenmigration, charakterisiert (Miyaki et al. 2009, Honjo et al. 2002). Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch nach druckinduzierter TRI, wobei die Gabe von Pitavastatin die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und P-Selektin reduzierte (Kawaji et al. 2007, Nakazawa et al. 2007). Wenngleich zurzeit keine Arbeiten zur Beeinflussung dieser Mechanismen durch Simvastatin nach *HIOF* vorliegen, legen Untersuchungen zu dessen Einfluss auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion in abweichenden retinalen Läsionsmodellen eine mit anderen Statinen vergleichbare Wirksamkeit nahe. So konnten Miyahara und Mitarbeiter zeigen, dass Simvastatin die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, sowie die Leukozytenadhäsion und -akkumulation bei Streptozotocin-induziertem Diabetes in der Retina reduziert (Miyahara et al. 2004).

Als weiteres therapeutisches *target* kann die Beeinflussung von Mikrogliazellen und Zytokinen durch Statine angesehen werden. Diverse Arbeiten zur Wirkung verschiedener Statine in unterschiedlichen Läsionsmodellen ergeben eine Vielfalt an Ergebnissen und postulieren teilweise widersprüchliche Effekte. Diese reichen von einer Hemmung der Mikrogliaaktivierung und Zytokinproduktion, über fehlende Beeinflussung dieser Parameter bis hin zu einer Verstärkung der inflammatorischen Antwort durch Statine. Potentiell antiinflammatorische Wirkungen beinhalten die verminderte Expression von *MHC-II* Molekülen und kostimulatorischen Signalen auf Mikrogliazellen im Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis durch Atorvastatin sowie die Hemmung der LPS-induzierten Expression von TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch Mikrogliazellen, Makrophagen und Astrozyten nach Lovastatinapplikation *in vitro* (Youssef et al. 2002, Pahan et al. 1997). In anderen Arbeiten konnten diese Effekte nicht reproduziert werden. Beispielsweise hat die intravenöse Gabe von Pravastatin vor Ligatur des optischen Nervs keinen Effekt auf die postischämische Expression von IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  und die Gabe von Pitavastatin lässt die im Modell der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) -induzierten Schädigung retinaler Ganglienzellen gesteigerte Expression dieser Zytokine unbeeinflusst (Gustavsson et al. 2008, Nakazawa et al. 2007). Andere Untersuchungen postulieren schließlich eine Zunahme der inflammatorischen Antwort durch Statine. Wie Bi und Mitarbeiter zeigen konnten, führen Mevastatin und Simvastatin zu einem Anstieg der TNF $\alpha$ -Expression sowie zu einer Aktivierung von Mikrogliazellen *in vitro*, sichtbar an einer Zunahme der

Anzahl OX-42 und ED-1 positiver Zellen und typischen morphologischen Veränderungen (Bi et al. 2004).

Im zweiten Teil der vorliegenden Studie sollte deshalb geklärt werden, ob durch Simvastatin das Ausmaß der oben beschriebenen Mikrogliaaktivierung und Zytokinproduktion nach TRI beeinflusst werden kann. Hierzu wurde einer Gruppe von Tieren einmalig eine Stunde postischämisch Simvastatin subkutan injiziert. Zur Untersuchung des alleinigen Injektionseffekts sowie einer möglichen Wirkung, der zur Lösung des Simvastatins verwendeten Substanzen, erhielt eine Vergleichsgruppe zum gleichen Zeitpunkt ein Vehikel (vgl. Abb. 5).

Zunächst untersuchten wir den Einfluss von Simvastatin auf die postischämische IL-1 $\beta$ -Expression. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Injektion von Vehikel als auch von Simvastatin zu einem Anstieg der *IL-1 $\beta$ -cDNA*-Spiegel zu frühen postischämischen Zeitpunkten führt (vgl. 5.3.1). Die auf Gen-Niveau sichtbaren Veränderungen ließen sich auch auf zellulärer Ebene nachweisen, wobei Simvastatin die Anzahl IL-1 $\beta$ -positiver Zellen 3 h und 6 h postischämisch erhöhte (vgl. 5.3.2). Wir fanden keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren mit Vehikel- und Statin-Behandlung, so dass der Anstieg der *IL-1 $\beta$ -Expression* primär nicht als Simvastatin-spezifischer Effekt angesehen werden darf. Vielmehr muss davon ausgegangen werden, dass es durch die subkutane Injektion oder durch die zur Lösung des Statins verwendeten Substanzen, wie z.B. Ethanol, zu einer frühen, temporären inflammatorischen Reaktion kommt. Diese war bereits 12 h postischämisch nicht mehr nachweisbar und ihre Relevanz konnte nicht abschließend geklärt werden. Zukünftige Untersuchungen mit Variationen der Applikationsart (beispielsweise peroral oder intravenös) könnten klären, ob substanzspezifische Effekte eine Rolle bei der gesteigerten IL-1 $\beta$ -Expression nach TRI spielen.

Nachdem IL-1 $\beta$ -positive Zellen im ersten Teil der Studie als OX42-positive Mikrogliazellen/Makrophagen identifiziert werden konnten und sich nun eine Zunahme IL-1 $\beta$ -positiver Zellen nach Statingabe fand, untersuchten wir im nächsten Schritt, ob die Anzahl OX42-positiver Zellen nach Statinapplikation ebenfalls verändert wäre. Eine Beeinflussung der Anzahl OX42-positiver Zellen durch Simvastatin ließ sich jedoch nicht nachweisen (vgl. 5.3.3), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Gabe von Simvastatin nach TRI das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung nicht beeinflusst. Eine von Bi und Mitarbeitern *in*



*vitro* gesehene Zunahme der Anzahl OX-42 positiver Zellen durch Simvastatin (Bi et al. 2004) konnte somit *in vivo* nicht bestätigt werden. Als wesentlicher, die Vergleichbarkeit der Untersuchungen stark begrenzender Aspekt muss hierbei der unterschiedliche Aktivierungsgrad von Mikrogliazellen *in vitro* und *in vivo* genannt werden.

Um abschließend zu beurteilen, ob bei gleichbleibender Zahl OX42-positiver Zellen und steigender Anzahl IL-1 $\beta$ -exprimierender Zellen andere Zelltypen an der IL-1 $\beta$ -Expression nach Statingabe beteiligt waren, wurde deren Zelltypzugehörigkeit untersucht. Dabei zeigte sich, dass IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen ausschließlich OX42-positiv waren. Eine Kolo-kalisation mit *GFAP* konnte auch nach Statingabe nicht nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass an der erhöhten IL-1 $\beta$ -Produktion nach Statingabe ausschließlich Mikrogliazellen und Makrophagen beteiligt sind (vgl. 5.3.4).

Abschließend wurde der Einfluss von Simvastatin auf die Expression von TNF $\alpha$  nach TRI untersucht. Hierbei zeigte sich keine signifikante Änderung der postischämischen TNF $\alpha$ -cDNA-Konzentration durch Simvastatin. Allerdings war ein tendenzieller Rückgang der TNF $\alpha$ -Genexpression 6 h und 12 h nach TRI erkennbar. Ursachen der fehlenden Signifikanz könnten in der kleinen Gruppengröße (n=4) und der insgesamt niedrigen Menge an TNF $\alpha$ -cDNA liegen (vgl. 5.3.5). Die Proteinexpression nach TRI und Statininjektion spiegelte die Genexpression wider und ließ dabei zusätzlich eine signifikante Reduktion der TNF $\alpha$ -Expression durch Simvastatin 12 h postischämisch erkennen (vgl. 5.3.6). Dieser Effekt war explizit nur nach der Gabe von Simvastatin nachweisbar. Die Injektion von Vehikel bewirkte hingegen eine leichte Zunahme der TNF $\alpha$ -Expression zu diesem Zeitpunkt, so dass zusammenfassend eine Simvastatin-spezifische Begrenzung des Ausmaßes der postischämischen TNF $\alpha$ -Expression postuliert werden muss.

Ähnliche Effekte fanden Pahan und Mitarbeiter, die eine Reduktion der LPS-induzierten TNF $\alpha$ -Expression durch Lovastatingabe nachweisen konnten (Pahan et al. 1997). Eine signifikante Abnahme der TNF $\alpha$ -Expression durch Simvastatin fand sich in der vorliegenden Arbeit erst 12 h postischämisch, während dieser Effekt 6 h nach TRI nur tendenziell und zum Zeitpunkt 3 h nicht nachweisbar war. Im Zusammenhang mit dieser Wirklatenz könnte eine verzögerte Resorption nach subkutaner Injektion stehen, so dass für zukünftige Untersuchungen die

intravenöse Injektion zu bevorzugen wäre. Hilfreich wären in diesem Zusammenhang Daten zur systemischen und intraretinalen Konzentration von Simvastatin nach subkutaner Injektion bei der Ratte, welche jedoch derzeit nicht zur Verfügung stehen.

Zusammenfassend konnte im zweiten Teil der Studie eine Beeinflussung der Mikrogliaaktivierung nach TRI durch Simvastatin nicht nachgewiesen werden. Sowohl Simvastatin- als auch Vehikelinjektion führten zu einem temporären Anstieg der postischämischen *IL-1 $\beta$* -Expression, so dass in diesem Zusammenhang nicht von einem substanzspezifischen Effekt ausgegangen werden kann. Simvastatin, jedoch nicht die Gabe von Vehikel, reduzierte nach einer Latenzzeit von mehr als 5 Stunden (entspricht Zeitpunkt 6 h nach TRI) das Ausmaß der postischämischen TNF $\alpha$ -Expression. Die postischämische Gabe von Simvastatin muss somit als entzündungsbegrenzende Maßnahme nach druckinduzierter retinaler Ischämie diskutiert werden.

## 7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Unsere Untersuchungen zeigen, dass OX42-positive Mikrogliazellen unter physiologischen Bedingungen in der Netzhaut vorkommen. Die Bedeutung ruhender Mikrogliazellen ist nicht abschließend geklärt, wenngleich ihre Kontroll- und Homöostasefunktion als gesichert gilt. Retinale Schädigung, wie sie durch *HIOP* hervorgerufen wird, führt zu einer Mikrogliazellaktivierung, sichtbar an einer Zunahme der Zellzahl und an charakteristischen morphologischen Veränderungen. Hierbei handelt es sich um ein hoch dynamisches Geschehen, bei dem innerhalb der ersten 24 Stunden nach Läsion unterschiedliche Entwicklungs- und Aktivierungsstufen durchlaufen werden. In der Vergangenheit wurde eine Beteiligung aktivierter Mikrogliazellen sowohl an neuroprotektiven als auch an neurodegenerativen Vorgängen postuliert. Eine abschließende Aussage über die Bedeutung der nachgewiesenen Mikrogliazellaktivierung nach TRI kann an dieser Stelle nicht getroffen werden. Als weiterer wesentlicher Bestandteil der inflammatorischen Antwort nach retinaler Ischämie muss die gesteigerte Expression proinflammatorischer Zytokine gelten. Unsere Untersuchungen zeigten eine ähnliche Expressionskinetik für die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  nach TRI, mit einem frühen postischämischen Maximum und einem Wiederabsinken innerhalb von 24 Stunden. Als IL-1 $\beta$ -exprimierende Zellen konnten nachfolgend OX42-positive Mikrogliazellen identifiziert werden. Ihre zentrale Rolle in der Pathogenese der ischämischen Retinaschädigung und die experimentelle Beeinflussbarkeit machen IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  zu wichtigen Angriffspunkten potentiell neuroprotektiver Strategien. In anschließenden Untersuchungen zur Modulation der beschriebenen Entzündungsreaktion zeigte sich eine Simvastatin-vermittelte Reduktion der postischämischen Expression von TNF $\alpha$ , was eine entzündungsbegrenzende Wirkung dieses Statins nahe legt. Eine Simvastatin-spezifische Beeinflussung der Mikrogliazellaktivierung und IL-1 $\beta$ -Expression ließ sich jedoch nicht nachweisen, so dass diese Zellen nicht als *target* der postulierten immunmodulatorischen Statinwirkung nach TRI angesehen werden können. Zusätzliche Untersuchungen werden notwendig sein, um die Zusammenhänge zwischen inflammatorischer Antwort und Ausmaß der retinalen Schädigung nach TRI aufzuklären und weitere Statin-vermittelte Effekte in diesem Modell zu prüfen.

## 8. LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

- Adachi M, Takahashi K, Nishikawa M, Miki H, Uyama M. 1996. High intraocular pressure-induced ischemia and reperfusion injury in the optic nerve and retina in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 234 (7):445-451.
- Albini TA, Wang RC, Reiser B, Zamir E, Wu GS, Rao NA. 2005. Microglial stability and repopulation in the retina. *Br J Ophthalmol*, 89 (7):901-903.
- Aldskogius H. 2001. Microglia in neuroregeneration. *Microsc Res Tech*, 54 (1):40-46.
- AMZV. 2006. Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz®: Floxal® Augentropfen, Stand der Informationen: Juni 2006
- Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. 1997. Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*, 28 (6):1233-1244.
- Barron KD. 1995. The microglial cell. A historical review. *J Neurol Sci*, 134 Suppl:57-68.
- Berger S, Savitz SI, Nijhawan S, Singh M, David J, Rosenbaum PS, Rosenbaum DM. 2008. Deleterious role of TNF-alpha in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (8):3605-3610.
- Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. 1998. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci*, 18 (5):1633-1641.
- Bi X, Baudry M, Liu J, Yao Y, Fu L, Brucher F, Lynch G. 2004. Inhibition of geranylgeranylation mediates the effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors on microglia. *J Biol Chem*, 279 (46):48238-48245.
- Block F, Schwarz M. 1998. The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. *Gen Pharmacol*, 30 (3):281-287.
- Bonne C, Muller A, Villain M. 1998. Free radicals in retinal ischemia. *Gen Pharmacol*, 30 (3):275-280.
- Brandstatter JH, Hartveit E, Sassoe-Pognetto M, Wassle H. 1994. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci*, 6 (7):1100-1112.
- Buchi ER, Suivaizdis I, Fu J. 1991. Pressure-induced retinal ischemia in rats: an experimental model for quantitative study. *Ophthalmologica*, 203 (3):138-147.
- Buttini M, Sauter A, Boddeke HW. 1994. Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 23 (1-2):126-134.
- Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M. 2003. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol*, 53 (6):743-751.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A. 2002. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm*, 10 (1):27-39.
- Chung HK, Lee IK, Kang H, Suh JM, Kim H, Park KC, Kim DW, Kim YK, Ro HK, Shong M. 2002. Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exp Mol Med*, 34 (6):451-461.

- Cimino M, Gelosa P, Gianella A, Nobili E, Tremoli E, Sironi L. 2007. Statins: multiple mechanisms of action in the ischemic brain. *Neuroscientist*, 13 (3):208-213.
- Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. 1999. The progression and topographic distribution of interleukin-1 $\beta$  expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19 (1):87-98.
- Davies MH, Eubanks JP, Powers MR. 2006. Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol Vis*, 12:467-477.
- Davis EJ, Foster TD, Thomas WE. 1994. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull*, 34 (1):73-78.
- Dick AD, Carter D, Robertson M, Broderick C, Hughes E, Forrester JV, Liversidge J. 2003. Control of myeloid activity during retinal inflammation. *J Leukoc Biol*, 74 (2):161-166.
- Diem R, Meyer R, Weishaupt JH, Bahr M. 2001. Reduction of potassium currents and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT phosphorylation by tumor necrosis factor-( $\alpha$ ) rescues axotomized retinal ganglion cells from retrograde cell death in vivo. *J Neurosci*, 21 (6):2058-2066.
- Dinarello CA. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, 87 (6):2095-2147.
- Dunn SE, Youssef S, Goldstein MJ, Prod'homme T, Weber MS, Zamvil SS, Steinman L. 2006. Isoprenoids determine Th1/Th2 fate in pathogenic T cells, providing a mechanism of modulation of autoimmunity by atorvastatin. *J Exp Med*, 203 (2):401-412.
- Farber K, Kettenmann H. 2005. Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev*, 48 (2):133-143.
- Feltgen N, Schmidt D, Hansen L. 2003. Arterielle retinale Verschlüsse. *Ophthalmologe*, 100:651-665.
- Fontaine V, Mohand-Said S, Hanoteau N, Fuchs C, Pfizenmaier K, Eisel U. 2002. Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2. *J Neurosci*, 22 (7):RC216.
- Glenn JA, Ward SA, Stone CR, Booth PL, Thomas WE. 1992. Characterisation of ramified microglial cells: detailed morphology, morphological plasticity and proliferative capability. *J Anat*, 180 ( Pt 1):109-118.
- Gobel W, Grehn F. 1998. [Angle-closure glaucoma. Etiology and differential diagnosis]. *Ophthalmologe*, 95 (3):191-205.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G. 1999. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*, 22:219-240.
- Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. 2006. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol*, 6 (5):358-370.
- Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. 2000. Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20 (1):53-65.
- Gustavsson C, Agardh CD, Hagert P, Agardh E. 2008. Inflammatory markers in nondiabetic and diabetic rat retinas exposed to ischemia followed by reperfusion. *Retina*, 28 (4):645-652.
- Hangai M, Yoshimura N, Honda Y. 1996. Increased cytokine gene expression in rat retina following transient ischemia. *Ophthalmic Res*, 28 (4):248-254.

- Hangai M, Yoshimura N, Yoshida M, Yabuuchi K, Honda Y. 1995. Interleukin-1 gene expression in transient retinal ischemia in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36 (3):571-578.
- Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40 (2):140-155.
- Hayreh SS, Weingeist TA. 1980. Experimental occlusion of the central artery of the retina. IV: Retinal tolerance time to acute ischaemia. *Br J Ophthalmol*, 64 (11):818-825.
- Hehlgans T, Pfeffer K. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115 (1):1-20.
- Honjo M, Tanihara H, Nishijima K, Kiryu J, Honda Y, Yue BY, Sawamura T. 2002. Statin inhibits leukocyte-endothelial interaction and prevents neuronal death induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol*, 120 (12):1707-1713.
- Hughes WF. 1991. Quantitation of ischemic damage in the rat retina. *Exp Eye Res*, 53 (5):573-582.
- Isenmann S, Kretz A, Cellerino A. 2003. Molecular determinants of retinal ganglion cell development, survival, and regeneration. *Prog Retin Eye Res*, 22 (4):483-543.
- Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H. 2008. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (9):4162-4168.
- Kawaji T, Inomata Y, Takano A, Sagara N, Inatani M, Fukushima M, Tanihara H, Honjo M. 2007. Pitavastatin: protection against neuronal retinal damage induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *Curr Eye Res*, 32 (11):991-997.
- Kitaoka Y, Kwong JM, Ross-Cisneros FN, Wang J, Tsai RK, Sadun AA, Lam TT. 2006. TNF-alpha-induced optic nerve degeneration and nuclear factor-kappaB p65. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47 (4):1448-1457.
- Kobori H, Harrison-Bernard LM, Navar LG. 2001. Enhancement of angiotensinogen expression in angiotensin II-dependent hypertension. *Hypertension*, 37 (5):1329-1335.
- Kocur I, Resnikoff S. 2002. Visual impairment and blindness in Europe and their prevention. *Br J Ophthalmol*, 86 (7):716-722.
- Kontiola AI, Goldblum D, Mittag T, Danias J. 2001. The induction/impact tonometer: a new instrument to measure intraocular pressure in the rat. *Exp Eye Res*, 73 (6):781-785.
- Langmann T. 2007. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol*, 81 (6):1345-1351.
- Larsen TA, Goodsell DS, Cascio D, Grzeskowiak K, Dickerson RE. 1989. The structure of DAPI bound to DNA. *J Biomol Struct Dyn*, 7 (3):477-491.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA, Pease ME. 2002. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (2):402-410.
- Lindberg C, Crisby M, Winblad B, Schultzberg M. 2005. Effects of statins on microglia. *J Neurosci Res*, 82 (1):10-19.
- Lipton P. 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79 (4):1431-1568.

- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. 1994. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke*, 25 (7):1481-1488.
- Löffler G, Petrides P, Hrsg. 2003. *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York, Hongkong, London, Mailand, Paris, Tokio: Springer, 824.
- Mason RP. 2006. Molecular basis of differences among statins and a comparison with antioxidant vitamins. *Am J Cardiol*, 98 (11A):34P-41P.
- Matsubara T, Pararajasegaram G, Wu GS, Rao NA. 1999. Retinal microglia differentially express phenotypic markers of antigen-presenting cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40 (13):3186-3193.
- Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Shudou M, Li C, Takahashi H, Imai Y, Tanaka J. 2007. Antibodies to CD11b, CD68, and lectin label neutrophils rather than microglia in traumatic and ischemic brain lesions. *J Neurosci Res*, 85 (5):994-1009.
- Menge T, Hartung HP, Stuve O. 2005. Statins--a cure-all for the brain? *Nat Rev Neurosci*, 6 (4):325-331.
- Miyahara S, Kiryu J, Yamashiro K, Miyamoto K, Hirose F, Tamura H, Katsuta H, Nishijima K, Tsujikawa A, Honda Y. 2004. Simvastatin inhibits leukocyte accumulation and vascular permeability in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Am J Pathol*, 164 (5):1697-1706.
- Miyaki K, Matsubara A, Nishiwaki A, Tomida K, Morita H, Yoshida M, Ogura Y. 2009. Pitavastatin attenuates leukocyte-endothelial interactions induced by ischemia-reperfusion injury in the rat retina. *Curr Eye Res*, 34 (1):10-17.
- Mizushima H, Zhou CJ, Dohi K, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Hirabayashi T, Arata S, Nakajo S, Takaki A, Ohtaki H, Shioda S. 2002. Reduced postischemic apoptosis in the hippocampus of mice deficient in interleukin-1. *J Comp Neurol*, 448 (2):203-216.
- Morrison JC, Johnson EC, Cepurna W, Jia L. 2005. Understanding mechanisms of pressure-induced optic nerve damage. *Prog Retin Eye Res*, 24 (2):217-240.
- Morrison JC, Moore CG, Deppmeier LM, Gold BG, Meshul CK, Johnson EC. 1997. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res*, 64 (1):85-96.
- Mosinger JL, Olney JW. 1989. Photothrombosis-induced ischemic neuronal degeneration in the rat retina. *Exp Neurol*, 105 (1):110-113.
- Nakazawa T, Takahashi H, Nishijima K, Shimura M, Fuse N, Tamai M, Hafezi-Moghadam A, Nishida K. 2007. Pitavastatin prevents NMDA-induced retinal ganglion cell death by suppressing leukocyte recruitment. *J Neurochem*, 100 (4):1018-1031.
- Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Skondra D, Miyahara S, Sobrin L, Thomas KL, Chen DF, Grosskreutz CL, Hafezi-Moghadam A, Miller JW. 2006. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Mol Vis*, 12:867-878.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308 (5726):1314-1318.
- ODDB. 2000. peer reviewed open drug database: Fachinformation zu Floxal® Augentropfen, Stand der Information Juni 2000.
- Olney JW, Price MT, Fuller TA, Labruyere J, Samson L, Carpenter M, Mahan K. 1986. The anti-excitotoxic effects of certain anesthetics, analgesics and sedative-hypnotics. *Neurosci Lett*, 68 (1):29-34.

- Osborne NN, Larsen A, Barnett NL. 1995. Influence of excitatory amino acids and ischemia on rat retinal choline acetyltransferase-containing cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 36 (8):1692-1700.
- Osborne NN, Casson RJ, Wood JP, Chidlow G, Graham M, Melena J. 2004. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*, 23 (1):91-147.
- Osborne NN, Ugarte M, Chao M, Chidlow G, Bae JH, Wood JP, Nash MS. 1999. Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol*, 43 Suppl 1:S102-128.
- Ozden S, Isenmann S. 2004. Neuroprotective properties of different anesthetics on axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *J Neurotrauma*, 21 (1):73-82.
- Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, Singh I. 1997. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest*, 100 (11):2671-2679.
- Patel HC, Boutin H, Allan SM. 2003. Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 992:39-47.
- Prasad R, Giri S, Nath N, Singh I, Singh AK. 2005. Inhibition of phosphoinositide 3 kinase-Akt (protein kinase B)-nuclear factor-kappa B pathway by lovastatin limits endothelial-monocyte cell interaction. *J Neurochem*, 94 (1):204-214.
- Pschyrembel W, Hrsg. 2004. *Klinisches Wörterbuch*. 260. Auflage. Berlin, New York: de Gruyter, 659, 887.
- Quigley HA. 1999. Neuronal death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*, 18 (1):39-57.
- Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta A, Michaelson MD, Hall DH, Kessler JA. 1997. Retinal ischemia leads to apoptosis which is ameliorated by aurintricarboxylic acid. *Vision Res*, 37 (24):3445-3451.
- Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Singh M, Gupta G, Gupta H, Li B, Roth S. 2001. Functional and morphologic comparison of two methods to produce transient retinal ischemia in the rat. *J Neuroophthalmol*, 21 (1):62-68.
- Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta H, Singh M, Aggarwal A, Hall DH, Roth S, Kessler JA. 1998. The role of the p53 protein in the selective vulnerability of the inner retina to transient ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39 (11):2132-2139.
- Safa R, Osborne NN. 2000. Retinas from albino rats are more susceptible to ischaemic damage than age-matched pigmented animals. *Brain Res*, 862 (1-2):36-42.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839):487-491.
- Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Siren AL. 1997. Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1beta (IL-1beta) and its receptor at mRNA and protein level. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17 (10):1107-1120.
- Schmeer C, Kretz A, Isenmann S. 2006. Statin-mediated protective effects in the central nervous system: general mechanisms and putative role of stress proteins. *Restor Neurol Neurosci*, 24 (2):79-95.
- Schmeer C, Kretz A, Isenmann S. 2007. Therapeutic potential of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors for the treatment of retinal and eye diseases. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6 (4):282-287.
- Schmeer C, Gamez A, Tausch S, Witte OW, Isenmann S. 2008. Statins modulate heat shock protein expression and enhance retinal ganglion cell survival



- after transient retinal ischemia/reperfusion in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (11):4971-4981.
- Shareef SR, Garcia-Valenzuela E, Salierno A, Walsh J, Sharma SC. 1995. Chronic ocular hypertension following episcleral venous occlusion in rats. *Exp Eye Res*, 61 (3):379-382.
- Shibuki H, Katai N, Yodoi J, Uchida K, Yoshimura N. 2000. Lipid peroxidation and peroxynitrite in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41 (11):3607-3614.
- Stefansson E, Wilson CA, Schoen T, Kuwabara T. 1988. Experimental ischemia induces cell mitosis in the adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 29 (7):1050-1055.
- Streit WJ. 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia*, 40 (2):133-139.
- Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. 1999. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, 57 (6):563-581.
- Sugiyama K, Gu ZB, Kawase C, Yamamoto T, Kitazawa Y. 1999. Optic nerve and peripapillary choroidal microvasculature of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40 (13):3084-3090.
- Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C, Braquet P. 1991. Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 32 (5):1471-1478.
- Takahashi K, Lam TT, Edward DP, Buchi ER, Tso MO. 1992. Protective effects of flunarizine on ischemic injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol*, 110 (6):862-870.
- Tezel G, Wax MB. 2000. Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells. *J Neurosci*, 20 (23):8693-8700.
- Thanos S. 1991. The Relationship of Microglial Cells to Dying Neurons During Natural Neuronal Cell Death and Axotomy-induced Degeneration of the Rat Retina. *Eur J Neurosci*, 3 (12):1189-1207.
- Touzani O, Boutin H, Chuquet J, Rothwell N. 1999. Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia. *J Neuroimmunol*, 100 (1-2):203-215.
- Tsujioka A, Ogura Y, Hiroshiba N, Miyamoto K, Kiryu J, Honda Y. 1998. In vivo evaluation of leukocyte dynamics in retinal ischemia reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39 (5):793-800.
- Uno H, Matsuyama T, Akita H, Nishimura H, Sugita M. 1997. Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17 (5):491-499.
- Vasthare US, Heinel LA, Rosenwasser RH, Tuma RF. 1990. Leukocyte involvement in cerebral ischemia and reperfusion injury. *Surg Neurol*, 33 (4):261-265.
- Wang CX, Shuaib A. 2002. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol*, 67 (2):161-172.
- Wang WH, Millar JC, Pang IH, Wax MB, Clark AF. 2005. Noninvasive measurement of rodent intraocular pressure with a rebound tonometer. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46 (12):4617-4621.
- Weber MS, Youssef S, Dunn SE, Prod'homme T, Neuhaus O, Stuve O, Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. 2006. Statins in the treatment of

- central nervous system autoimmune disease. *J Neuroimmunol*, 178 (1-2):140-148.
- Weitz-Schmidt G. 2002. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci*, 23 (10):482-486.
- Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U. 2001. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*, 7 (6):687-692.
- Welsch U, Hrsg. 2003. *Lehrbuch Histologie*. 1. Auflage. München, Jena: Urban & Fischer Verlag, 526.
- Wohl SG, Schmeer CW, Witte OW, Isenmann S. 2010. Proliferative response of microglia and macrophages in the adult mouse eye after optic nerve lesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51 (5):2686-2696.
- Yan HQ, Banos MA, Herregodts P, Hooghe R, Hooghe-Peters EL. 1992. Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur J Immunol*, 22 (11):2963-2971.
- Yoneda S, Tanihara H, Kido N, Honda Y, Goto W, Hara H, Miyawaki N. 2001. Interleukin-1beta mediates ischemic injury in the rat retina. *Exp Eye Res*, 73 (5):661-667.
- Yoshida S, Yoshida A, Ishibashi T. 2004. Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 242 (5):409-413.
- Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, Bravo M, Mitchell DJ, Sobel RA, Steinman L, Zamvil SS. 2002. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*, 420 (6911):78-84.
- Zhang C, Tso MO. 2003. Characterization of activated retinal microglia following optic axotomy. *J Neurosci Res*, 73 (6):840-845.
- Zhang C, Lam TT, Tso MO. 2005a. Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Exp Eye Res*, 81 (6):700-709.
- Zhang C, Shen JK, Lam TT, Zeng HY, Chiang SK, Yang F, Tso MO. 2005b. Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. *Mol Vis*, 11:887-895.
- Zheng L, Gong B, Hatala DA, Kern TS. 2007. Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48 (1):361-367.
- Zhou Y, Lindner LE, Chiou GC, Morgan KP, Li Z. 2000. Transient retinal ischemia-reperfusion in rats. *Chin Med J (Engl)*, 113 (5):461-465.

## 9.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Isenmann für die Überlassung des Themas. Seine fachlich hervorragende Betreuung und die engagierte Unterstützung haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Otto Witte danke ich für die freundliche Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten zur Durchführung der Experimente im Forschungszentrum Lobeda.

Sehr herzlich möchte ich Herrn Dr. Christian Schmeer für die Anregung zu diesem Projekt und die kontinuierliche Betreuung meiner Promotion danken. Er führte mich in das wissenschaftliche Arbeiten ein und hatte von Beginn an ein offenes Ohr für alle Fragen. Durch seine freundschaftliche Art und zahlreiche aufmunternde Worte blieb auch in schwierigen Augenblicken die Motivation und Begeisterung für das Forschungsthema erhalten.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Svetlana Tausch, die mich in die wesentlichen Grundlagen der Labortätigkeit eingewiesen und immer wieder bei methodischen Problemen unterstützt hat.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschungsgruppe Experimentelle Neurologie danke ich für ihre kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Der Ernst-Abbe-Stiftung danke ich für die großzügige Unterstützung durch das Promotionsstipendium, welches es mir ermöglichte mich intensiv der Labortätigkeit zu widmen.

Von ganzen Herzen danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich in allen schwierigen Situationen unterstützt haben, sowie meinem Freund Martin Metzler, für die fortwährende Ermutigung und emotionale Unterstützung.

### 9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,  
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,  
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Stefan Isenmann, Dr. Christian Schmeer,  
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,  
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und  
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Erfurt, den 27. Mai 2010

---

Franziska Walther